E. Kiesekamp

Düsseldorf 1974

2. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Universität Düsseldorf

Biologische Effekte der aktiven Immunisierung gegen Steroid - Hormone

Habilitationsschrift

Der hohen medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Eberhard Nieschlag

1974

UNIV.
LEIDEN
NED.

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung 1

I. Antikörper gegen Hormone in der Endokrinologie 1

II. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit 3

B. Experimente, Methoden, Materialien 5

I. Übersicht über die Versuche 5

II. Methoden 6

1. Handhabung der Tiere und Operationen 6

2. Immunisierung 7

a) Steroidkonjugate 7
b) Immunisierungsverfahren 8
c) Antiserum-Titer 8
d) Spezifität der Antiseren 9

3. Hormonkonzentrationen im Serum 10

a) Dehydroepiandrosteron, Oestrogene, Gesamt-Corticoide, LH und FSH 10
b) Simultaner Radioimmunoassay für Testosteron und Androstendion 10

4. Prozentuale Bindung der Steroide im Serum 13

5. Testosteron-Konzentration in den Hoden 14

6. HCG-Stimulation der Testes in vitro 15

7. Halbwertszeit von Testosteron im Plasma nach Kastration 17

8. Zyklisches AMP im Prostatagewebe 17

9. Sexuelle Aktivität 18

10. Histologische Methoden 18

a) Testes 18
b) Nebennierenrinden 19
c) Akzessorische Geschlechtsdrüsen 19

III. Substanzen und Reagenzien 20

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543915_0107

C. Ergebnisse 21

I. Produktion von Antiseren 21

II. Effekte der aktiven Immunisierung mit Testosteron auf Funktion und Morphologie der Testes 23

1. Konzentration und prozentuale Bindung von Testosteron im Serum 23

2. Sexuelle Aktivität 23

3. Akzessorische Geschlechtsdrüsen 24

4. Morphologie der Testes 25

5. Testikuläre Testosteron-Konzentration 25

6. Stimulierbarkeit der Testes durch HCG 25

7. Halbwertszeit von Testosteron in der peripheren Zirkulation 26

III. Einfluss der aktiven Immunisierung mit verschiedenen Androgenen, Oestrogenen und Corticosteroiden auf Funktion und Morphologie der Testes und der Nebennierenrinden 26

1. Morphologie der Testes 26

2. Morphologie der Nebennierenrinden 27

3. Funktion der Testes und der Nebennierenrinden 28

D. Diskussion 30

I. Neutralisation der biologischen Aktivität von Steroiden durch Antikörper 30

II. Aktive Immunisierung mit Steroiden als Methode zum Studium endokriner Feedback-Kontrollmechanismen 35

III. Charakterisierung der biologischen Effekte der aktiven Immunisierung gegen Testosteron 41

1. Biochemische und morphologische Charakterisierung der Hoden Testosteron-immunisierter Tiere 42

2. Metabolismus von Testosteron im immunisierten Tier 44

3. Einfluss der aktiven Immunisierung mit Testosteron auf die akzessorischen Geschlechtsdrüsen 45

IV. Abgrenzung der Immunisierung gegen Hormone gegenüber verwandten Phänomenen 46

V. Potentielle Anwendungen der Immunisierung gegen Hormone in der Medizin 48

E. Zusammenfassung 50

F. Abbildungen und Tabellen 53

G. Literatur 79

H. Dankvermerk 95

A. Einleitung

I. Antikörper gegen Hormone in der Endokrinologie

Die Neutralisierung biologisch aktiver Moleküle ist eines der ältesten Themen der Immunologie. Die intensive Forschung auf diesem Gebiet hat zu einer Reihe von praktischen Anwendungen in der Medizin geführt, von denen als Beispiel die Immunisierung gegen Diphtherie- und Schlangen-Toxine erwähnt sei. Endokrinologen haben demgegenüber der Möglichkeit, Hormone durch Antikörper zu inaktivieren, nur sehr geringes Interesse entgegengebracht und haben sich eigentlich nur gezwungenermassen mit dieser Problematik befasst, wenn nämlich Patienten im Zuge einer Behandlung mit Insulin, ACTH oder Wachstumshormon durch die Bildung von Antikörpern eine Resistenz gegen diese Hormone entwickelten. Bei der Untersuchung des Phänomens der Insulin-Resistenz wurde dann auch erstmalig nachgewiesen, dass Hormone überhaupt die Bildung von Antikörpern induzieren können (DEPISCH & HASENÖRL 1928; LEWIS 1937; BANTING et al. 1938). Das Interesse an Antikörpern gegen Hormone wuchs jedoch enorm durch die Einführung der radioimmunologischen Bestimmung von Insulin (YALOW & BERSON 1959), das auf der Kompetition des radioaktiv markierten und des nicht-markierten Hormons um die Bindung an den Antikörper basiert. Durch diese sensible Nachweismethode, die nachfolgend schrittweise auf alle Proteo- und Peptidhormone ausgedehnt werden konnte, erhielt die endokrinologische Forschung und Diagnostik wesentliche neue Impulse.

Während die Produktion von Antiseren gegen Proteohormone aufgrund ihres vergleichsweise grossen Molekulargewichtes keine Probleme darstellt, sind Steroidhormone

primär keine Antigene, da ihr Molekulargewicht unter der kritischen Grenze von etwa 1000 liegt. Sie können jedoch als Haptene an grössere Trägermoleküle gekoppelt Antigencharakter erhalten.

Hapten	+	Carrier	=	Antigen
Steroid	+	Makromolekül (z. B. Albumin)	=	Steroid - Konjugat
↓				↓
nicht immunogen				immunogen

Über lange Jahre wurden Versuche unternommen, stabile Steroid-Konjugate herzustellen, um damit Antikörper zu produzieren. In den ersten Versuchen wurden jedoch meist Esterbindungen zur Steroid-Protein-Koppelung verwandt (z.B. MOOSER & GRILLICHES 1941), die nach Injektion im tierischen Organismus gespalten werden, ehe sie eine antigene Wirkung entfalten konnten. Erst gegen Ende der fünfziger Jahre gelang es, stabile Konjugate herzustellen und damit die Antikörperbildung im Versuchstier zu induzieren (ERLANGER et al. 1957; GOODFRIEND & SEHON 1958).

Interessanterweise gehörte die Gruppe um LIEBERMAN, nach deren Angaben noch heute alle Steroid-Konjugate hergestellt werden, zu den wenigen Forschergruppen, die sich vorwiegend mit den physiologischen Effekten der Immunisierung gegen Hormone und nicht so sehr mit der Methodik der Hormonbestimmung befasste. Entsprechend wurden die Anti-

seren gegen Steroide zuerst in Experimenten verwandt, die sich der passiven Immunisierung zum Studium biologischer Effekte von Steroiden bedienten (LIEBERMAN et al. 1959; NERI et al. 1964; FERIN et al. 1968). Es bleibt eine Ironie der endokrinologischen Geschichte, dass Radioimmunoassays für Proteohormone bereits für ein Jahrzehnt etabliert waren, bevor man auf die Idee kam, dieses Prinzip auf die Steroidhormone anzuwenden und mit einem Steroidantiserum, das dann auch schon bereits 10 Jahre vorhanden war, einen Steroid-Radioimmunoassay zu schaffen. Die erfolgreiche Einführung dieser Technik in die Steroidanalytik (ABRAHAM 1969; MIKHAIL et al. 1970) führte zur Entwicklung zahlreicher Radioimmunoassays für Steroide (Zur Übersicht siehe: PERON & CALDWELL 1971; SKELLEY et al.1973; ABRAHAM 1974; JAMES & JEFFCOATE 1974) und hatte die Immunisierung stattlicher Zahlen von Versuchstieren zur Folge. Diesmal jedoch wurden die biologischen Effekte der aktiven Immunisierung mit Steroiden weitgehend vernachlässigt und die Gruppe derer, die diesen Phänomenen nachging, blieb klein.

II. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die eigenen Untersuchungen, die sich mit den biologischen Auswirkungen der Immunisierung gegen Steroide befassen, nahmen ihren Ursprung in Versuchen, ein möglichst praktikables Verfahren zur schnellen Entwicklung von Steroidantiseren für Radioimmunoassay-Zwecke zu gewinnen. Im Verlaufe dieser - erfolgreichen - Versuche (VAITUKAITIS et al. 1971; NIESCHLAG & LORIAUX 1972; NIESCHLAG et al.1972; NIESCHLAG et al. 1974) verlagerte sich das Interesse jedoch mehr vom Radioimmunoassay auf das Versuchstier selbst, in dem das Antiserum erzeugt wurde. Denn zum Zeitpunkt, als wir unsere Untersuchungen begannen, war zwar prinzipiell bekannt, dass auch Steroidhormone durch Antikörper in ihrer

biologischen Aktivität gehemmt werden können. Diese Feststellung beruhte jedoch ausschliesslich auf Versuchen, die sich der passiven Immunisierung bedienten, die entsprechend der Halbwertszeit der Antikörper nur Kurzzeiteffekte hervorrufen kann. Es war jedoch nicht bekannt, welche Effekte die aktive Immunisierung hervorruft, bei der die Tiere über längere Zeiträume - über Wochen, Monate und manchmal Jahre - zirkulierenden, endogen gebildeten Hormonantikörpern ausgesetzt sind. Die möglichen biologischen Auswirkungen der aktiven Immunisierung gegen Steroide zu studieren, war das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit. In dieser Hinsicht wurden exemplarische Untersuchungen am männlichen, gegen Testosteron immunisierten Versuchstier vorgenommen. Dabei wurden die verschiedensten biologischen, biochemischen und morphologischen Aspekte berücksichtigt. Darüber hinaus wurde versucht, die aktive Immunisierung gegen Steroide als Methode zum Studium von hypothalamo-hyperphysär-gonadalen und -adrenalen Regelkreisen zu verwenden, wobei morphologische und funktionelle Parameter herangezogen wurden. Schliesslich wurden diese Versuche aber auch im Hinblick auf die mögliche Anwendbarkeit der Immunisierung gegen Hormone als therapeutische Massnahme in der Humanmedizin unternommen und sind letztlich als Vorversuche zu dieser Fragestellung zu betrachten.

B. Experimente, Methoden, Materialien

I. Übersicht über die Versuche

In den ersten Versuchen wurden geschlechtsreife, männliche Neuseeland-Kaninchen mit Testosteron oder Oestradiol immunisiert. Zur Immunisierung wurde ein intradermales Verfahren verwandt, das Booster-Injektionen überflüssig macht. Nach der Entwicklung hoher Antikörpertiter wurden die Tiere gonadektomiert und in zur Zeit der Operation gewonnenen Serumproben wurde die Konzentration von Testosteron und die prozentuale Bindung von Testosteron und Oestradiol bestimmt. Die Testes wurden gewogen und histometrisch ausgewertet. Zusätzlich wurde als morphologischer Parameter für die Zellaktivität das Kernvolumen der Leydig-Zellen bestimmt.

Zur näheren biochemischen Charakterisierung der Testes wurde die testikuläre Testosteron-Konzentration und die Testosteron-Synthese unter HCG-Stimulation *in vitro* gemessen.

Um Aufschlüsse über die biologische Aktivität antikörpergebundenen Testosterons zu erhalten, wurde die sexuelle Aktivität immunisierter Kaninchen registriert und die akzessorischen Geschlechtsdrüsen wurden morphologisch und biochemisch untersucht.

Die Halbwertszeit von Testosteron wurde über den Abfall der Serumkonzentration nach Kastration bestimmt, um Aufschlüsse über den Testosteron-Metabolismus im immunisierten Tier zu erhalten.

Zum Studium der hypothalamo-hypophysär-gonadalen und -adrenalen Regelkreise wurden weitere 8 Gruppen männlicher Kaninchen mit Proteinkonjugaten von Testosteron, 5α-Dihydrotestosteron, 5ß-Dihydrotestosteron, Androstendion Dehydroepiandrosteron, Oestradiol, Cortisol und Aldosteron immunisiert. Die Tiere mit den besten Antikörpertitern wurden 7 - 14 Wochen nach der Immunisierung adrenalektomiert und gonadektomiert. Im Serum wurde die Konzentration von Testosteron, Androstendion, Dehydroepiandrosteron, Oestron, Oestradiol, der Gesamt-Corticoide, von LH und FSH und die prozentuale Bindung von Corticosteron, Cortisol Aldosteron, Dehydroepiandrosteron, Androstendion, Testosteron und Oestradiol gemessen. Die Spezifität der Antiseren wurde bestimmt. Morphologisch wurden die Nebennierenrinden auf die Kernvolumina der Zellen in den drei Zonen (Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis) hin untersucht. Zur Beurteilung der Testes wurden die bereits erwähnten Kriterien herangezogen.

II. Methoden

1) Handhabung der Tiere und Operationen

Zu allen Versuchen wurden randomisiert gezüchtete männliche weisse Neuseeland-Kaninchen in geschlechtsreifem Alter verwandt (2,5 - 3,2 kg bei Beginn der Versuche). Zu jeder Gruppe immunisierter Tiere gehörten eine gleichaltrige Gruppe von Kontrolltieren, die unter denselben Bedingungen gehalten und zu denselben Zeiten (also auch Jahreszeiten) wie die entsprechenden immunisierten Tiere untersucht wurden.

Die Tiere wurden in klimatisierten und licht-standardisierten (12 / 12 Std.) Räumen untergebracht und erhielten

ein kommerzielles Fertigfutter ad libidum ("Alleinfutter für Kaninchen K 813 ", Höveler, Langenfeld / Rhld.).

Blut für die laufenden Kontrolluntersuchungen wurde aus Ohrvenen nach Hyperämisierung mit Xylol entnommen.

Die Operationen wurden entweder unter Äther- (Äther pro narcosi, Hoechst AG) oder Pentobarbital- (Nembutal R 20 - 40 mg/kg Körpergewicht, Abbott) Narkose durchgeführt. Die Tiere, die nicht nur kastriert wurden, wurden nach Einleitung der Narkose durch Herzpunktion entblutet und die für die weiteren Untersuchungen entnommenen Organe oder Organteile wurden sofort weiter verarbeitet.

Die gewonnenen Blutproben wurden für etwa eine Stunde bei 4° C bis zur vollständigen Gerinnung aufbewahrt. Anschliessend wurde nach Zentrifugation in der Kühlzentrifuge Serum gewonnen, das zur Konservierung mit Natrium-Azid in einer Endkonzentration von 0,1 % versetzt wurde. Falls sich die weitere Verarbeitung nicht sofort anschloss, wurden die Proben bei -20° C aufbewahrt.

2.) Immunisierung

a) Steroidkonjugate

Die verschiedenen Steroide wurden mittels der von ERLANGER et al. (1957, 1966) angegebenen Methoden an Rinder-Serum-Ablumin gekoppelt. Testosteron, Androstendion, 5 α-Dihydrotestosteron, 5ß-Dihydrotestosteron und Aldosteron wurden über Position 3, 6-Keto-Oestradiol über Position 6 und Dehydroepiandrosteron über Position 17 als Oxime und Cortisol über Position 21 als Hemisuccinat gekoppelt.

Beispielhaft sei der Reaktionsgang für die Koppelung

von Dehydroepiandrosteron dargestellt. Dehydroepiandrosteron wurde zunächst mit Hilfe von (O-carboxymethyl-) hydroxylamin (K & K Laboratories) in seine Oximform überführt. Die eigentliche Koppelung an das Protein wurde durch eine gemischte Anhydrid-Reaktion mit Isobutylchlorocarbonat (K & K Laboratories) vorgenommen (Abb. 1). Anschliessend wurde das Konjugat dialysiert, lyophilisiert und dann gekühlt aufbewahrt.

b) Immunisierungsverfahren

Zur Immunisierung wurde das von uns speziell für Steroid-Konjugate und kleinmolekulare Substanzen entwickelte Verfahren angewandt, das auf einer einmaligen intradermalen Injektion an zahlreichen Körperstellen beruht (VAITUKAITIS et al. 1971; NIESCHLAG 1974). Dazu wurden 100 µg des betreffenden Steroid-Konjugates in komplettem FREUND'schen Adjuvans (Difco, Detroit) und physiologischer Kochsalzlösung (1 : 1 bis 1 : = v/v) unter Zusatz weiterer Tuberkelbakterien (etwa 20 mg pro Tier) emulgiert. Die Kaninchen wurden mit einem elektrischen Scherapparat auf dem Rücken und an den Oberschenkeln rasiert. Die Emulsion wird dann verteilt über die rasierten Hautteile intradermal an 20 bis 40 Stellen injiziert, gefolgt von einer subkutanen Injektion von 0,5 ml Pertussis-Vakzin (P-Impfstoff, Behring-Werke, Marburg). Booster-Injektionen werden nicht gegeben. Die Antikörperbildung wird von der 3. Woche nach der Immunisierung an in ein- bis zweiwöchigen Abständen überprüft, indem der Antiserumtiter bestimmt wird.

c) Antiserum-Titer

Der Antiserum-Titer ist definiert als die Serumverdünnung, bei der 50 % einer bestimmten Menge radioaktiven

Steroids gebunden wird (ODELL et al. 1971; ABRAHAM 1974). Dazu wurde von jedem Serum eine Verdünnungsreihe mit Diluent von 1/200, 1/2000, 1/4000 usw. bis 1/256000 aufgestellt und jede Verdünnung mit 6000 bis 10000 cpm des tritiierten Steroids versetzt, gegen das das Tier immunisiert worden war. Lediglich bei den gegen 5ß-Dehydrotestosteron immunisierten Tieren wurde tritiiertes 5α-Dehydrotestosteron benutzt. Nach Inkubation bei 4° C über Nacht wurden Antikörper-gebundenes und freies Steroid durch Kohle getrennt und die Radioaktivität im Überstand gemessen. Im einzelnen wurde dabei wie im Radioimmunoassay für Testosteron und Androstendion unter 3b angegeben vorgegangen. Der Titer wurde dann graphisch ermittelt (Beispiel in Abb. 3).

d) Spezifität der Antiseren

Zur Bestimmung der Spezifität wurden Dosiswirkungskurven für das Steroid, gegen das das Tier immunisiert worden war (Steroid A) und für alle auf ihre Kreuzreaktivität hin untersuchten Steroide (Steroid B) erstellt. Eine konstante Menge des tritiierten Steroids A wurde zu allen Ansätzen gegeben. Bei den mit 5ß-Dehydrotestosteron immunisierten Tieren wurde tritiiertes 5α-Dehydrotestosteron verwandt. Nach Inkubation bei 4° C über Nacht wurde Antikörper-gebundenes und freies Steroid durch Kohle getrennt und die Radioaktivität im Überstand gemessen (s. B II, 3b). Die prozentuelle Kreuzreaktivität wurde dadurch berechnet, dass die Menge Steroid A, die zur Verdrängung von 50 % Radioaktivität vom Antikörper benötigt wurde durch die Menge des dazu benötigten Steroid B dividiert und mit 100 multipliziert wurde (ABRAHAM 1969). Ein Beispiel somit gewonnener Dosiswirkungskurven gibt Abb. 4.

3.) Hormonkonzentrationen im Serum

a) Dehydroepiandrosteron, Oestrogene, Gesamt-Corticoide, LH und FSH

Mit Hilfe spezifischer Radioimmunoassays wurde die Serum-Konzentrationen von Testosteron, Androstendion, Dehydroepiandrosteron, Oestron, Oestradiol, LH und FSH bestimmt, mit Hilfe der kompetitiven Proteinbindung die der Gesamt-Corticoide. Während die Methoden für Dehydroepiandrosteron (NIESCHLAG et al. 1972) für Oestron und Oestradiol (BIEDLINGMEIER et al. 1973), Gesamt-Corticoide (KLEY & KRÜSKEMPER 1971) und FSH und LH (DUFY-BARBE et al. 1973) bereits veröffentlicht sind und für Einzelheiten auf die entsprechenden Publikationen verwiesen werden kann, wurde Androstendion zusammen mit Testosteron in einem bisher noch nicht publizierten Radioimmunoassay bestimmt. Daher werden Einzelheiten der Methode im folgenden beschrieben und können als Beispiel für die verwandten Radioimmunoassays für Steroide betrachtet werden.

b) Simultaner Radioimmunoassay für Testosteron und Androstendion

Dieser simultane Radioimmunoassay stellt eine Erweiterung unseres Radioimmunoassays für Testosteron dar (NIESCHLAG & LORIAUX 1972; NIESCHLAG 1974), wobei der Radioimmunoassay für Testosteron praktisch unverändert blieb und der Radioimmunoassay für Androstendion im Prinzip wie der für Testosteron durchgeführt wurde, mit dem Unterschied, dass Standards, markierte Tracer und Antiseren für Testosteron durch solche für Androstendion ersetzt wurden. Eine Übersicht über diesen Radioimmunoassay findet sich in Abb. 5.

Zur Bestimmung im Serum der Testosteron-, Androstendion- und Dehydrotestosteron- immunisierten Tiere wurde von 1 ml einer 1 : 10 Verdünnung des Serums mit physiologischer Kochsalzlösung ausgegangen, bei allen anderen Tieren von 1 ml nativem Serum. In einer Serie wurden meist 22 unbekannte Serumproben zusammen mit einer Probe Standardplasma (1 ml) und einer weiteren Wasserprobe von 1 ml, die als Blank-Wert diente, analysiert. Zu allen Proben wurden je 1000 cpm (1,2,6,7-^{3}H)- Testosteron und (1,2-^{3}H)- Androstendion (NEN, Dreieichenhain) in 50 µl Methanol (Merck AG, Darmstadt) pipettiert. Nach sorgfältiger Durchmischung wurden die Proben über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am folgenden Tage mit 2 x 5 ml Äther extrahiert (Äther pro narcosi, Hoechst AG). Die Ätherphasen wurden unter einem Luftstrom bei 35° C im Wasserbad getrocknet. Die Rückstände wurden mit 2 x 75 µl Methanol auf fertige mit Silica beschichtete Dünnschichtplatten mit einem Fluorescenzindikator (Merck AG) aufgetragen. Testosteron und Androstendion Standards wurden auf den äusseren Bahnen der Platten appliziert, die dann in dem System Chloroform/ Äthylacetat/Petroleumäther (60°) 50 : 45 : 5 (v/v) (Merck AG)entwickelt wurden. In diesem System hat Testosteron einen R_f-Wert von 0,45 und Androstendion von 0,65. Die Standards wurden im ultravioletten Licht lokalisiert und die Testosteron und Androstendion Standards entsprechenden Felder wurden in getrennte mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipetten, die mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden waren, aspiriert. Von dieser Mini-Säule wurden die Steroide mit jeweils 5 ml Methanol eluiert. Nach Evaporierung wurden die Rückstände in 1,0 ml Methanol gelöst, so dass das Endvolumen nach Chromatographie dem anfänglichen Probenvolumen entsprach. In 0,5 ml der Methanolphasen wurde die Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillationszählung zur Berechnung der Verluste bestimmt. Zwei 0,1 ml Aliquote der Testosteron-Röhrchen wurden für den Testosteron-Assay

genommen und je zwei 0,2 ml Aliquote von den Androstendion-Röhrchen für den Androstendion-Assay.

Der eigentliche Assay wurde in 10 - 75 ml Einmal-Glasröhrchen durchgeführt. Standards von 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 0,7, 1,0, 2,0, 5,0 und 10,0 ng Testosteron (Merck AG) und Standards von 0,005, 0,01, 0,25, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 0,7, 1,0 und 2,0 ng Androstendion (Steraloids) in Methanol wurden als Doppelwerte in Inkubationsröhrchen pipettiert und im Wasserbad unter Luftstrom getrocknet. Zwei leere Röhrchen wurden zu jedem Assay für die Null-Bindung (B_0) und zwei weitere für die unspezifische Bindung (B_n) hinzugefügt. Zu allen Röhrchen wurden dann 0,5 ml Diluent (0,1 % Rinder-Gamma-Globulin in sterilisierter physiologischer Kochsalzlösung), die entweder 250000 cpm (1,2,6,7-^{3}H)-Testosteron oder 20000 cpm (1,2-^{3}H)-Androstendion enthielten, hinzupipettiert. Die radioaktiven Tracer wurden alle drei Monate routinemässig durch Dünnschichtchromatographie gereinigt. Danach wurden jeweils 0,5 ml des Androstendion- oder Testosteron-Antiserums in der entsprechenden Verdünnung in Diluent hinzugegeben. Das Testosteron-Antiserum wurde in einer endgültigen Verdünnung von 1/80000 und das Androstendion-Antiserum von 1/50000 verwandt. Anstelle des Antiserums wurden 0,5 ml Diluent zu allen B_n-Röhrchen hinzugegeben.

Alle Proben wurden über Nacht bei 4° C inkubiert. Danach wurden Antikörper-gebundenes und freies Steroid durch Dextran/Globulin beschichtete Kohle getrennt. Die Kohle-Suspension wurde jeweils am Abend vorher angesetzt und über Nacht im Kühlraum gerührt und bestand aus 250 mg Kohle (Norit A, Serva), 250 mg Dextran T70 (Pharmacia) und 100 ml Rinder-Gamma-Globulin (Behring-Werke) in 100 ml

physiologischer Kochsalzlösung. 12 Minuten nach Hinzufügen der Kohle wurden die Proben mit 3000 rpm und bei 4° C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in mit 3 [illegible] Dioxan (Merck AG) gefüllte Szintillationsgefässe dekantiert. 10 ml des Szintillators (bestehend aus 1 Teil Liquifluor^{R}, NEN, und 19 Teilen Toluol, Merck AG) wurden dazugegeben und die Radioaktivität nach Mischen und Kühlen in einem Packard Szintillationszähler (Modell 3380) gezählt, bis 10000 cpm akkumuliert waren. Die Ergebnisse wurden mit einer Logit-Transformation (RODBARD et al. 1969) berechnet und die Werte wurden für die Verlust korrigiert. Die Standardkurven sind gewöhnlich linear über den gesamten angesetzten Dosisbereich.

Die Verlässlichkeitskriterien der Methode sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Darüber hinaus wird die Spezifität der Methode durch die Spezifität der Antiseren bestimmt, die entsprechend den Angaben unter B II, 2 d gemessen wurde und in Tabelle 2 angegeben ist. Sowohl Testosteron wie Androstendion wurden durch die Dünnschichtchromatographie von den kreuzreagierenden Steroiden getrennt, d.h. Testosteron wurde von 5α-Dihydrotestosteron und Androstendion getrennt und Androstendion seinerseits wurde von Dehydroepiandrosteron, Testosteron und 5α-Dihydrotestosteron getrennt. Die Blank-Werte beider Methoden liegen normalerweise im Bereich der B_0-Werte, aber steigen gelegentlich auf 5 pg im Radioimmunoassay für Androstendion und auf 10 pg im Radioimmunoassay [illegible] Testosteron an und werden dann nicht von den Werten subtrahiert.

4.) Prozentuale Bindung der Steroide im Serum

Die prozentuale Bindung der in Tabelle 9 angegebenen

Steroide wurde nach FOREST et al. (1968) durch Äquilibriumdialyse bei 37° C bestimmt. Die Ergebnisse wurden nach der Formel von SLAUNWHITE & SANDBERG (1959) berechnet.

5.) Testosteron-Konzentration im Hoden

Die frisch entnommenen Hoden wurden gewogen und bei -20° C eingefroren. Zur Analyse wurden von jedem Hoden drei etwa 100 mg schwere Stücke, deren exaktes Gewicht auf der Mikrowaage bestimmt wurde, zusammen mit 3000 cpm (1,2-^{3}H)-Testosteron in 75 µl Methanol und 5 ml Äther im Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenisat wurde in Schliffgläser überführt und der Homogenisator mit 2 ml Äther nachgespült. Der zellfreie Überstand, nach 5 Minuten Zentrifugation bei 3000 rpm, wurde in weitere Schliffgläser überführt, der Bodendatz erneut mit 5 ml Äther aufgeschüttelt und nach einer weiteren Zentrifugation wurden die kombinierten Ätherphasen bei 35° C im Wasserbad unter Luftstrom getrocknet.

Der Rückstand wurde mit 3 x 100 µl Methanol auf Dünnschichtplatten aufgetragen und im Systemchloroform/Äthylazetat/Petroleumäther (60°) 50 : 45 : 5 (v/v) zur Isolierung von Testosteron entwickelt. Wie unter B, II, 3b angegeben, wurde Testosteron mittels seitlich aufgetragener Standards identifiziert und die entsprechenden Felder in Mini-Säulen aufgenommen, von denen Testosteron mit 5 ml Methanol eluiert wurde. Die Methanolphasen wurden im Wasserbad bei 45° C unter Luftstrom getrocknet und der Rückstand in exakt 2 ml Methanol aufgenommen, wovon die Hälfte zur Bestimmung der Recovery direkt in Szintillationsgläser gegeben wurde und nach Eindampfen und Hinzufügen von 10 ml Szintillator im Szintillationszähler gezählt wurde.

Die eigentliche Bestimmung von Testosteron wurde radioimmunologisch analog zu der unter B II, 3b angegebenen Methode für Serum durchgeführt, in dem vom verbliebenen Volumen je 2 Aliquote zu 50 und 100 µl verwandt wurden. Standardkurve, Inkubation, Trennung, Zählung der Radioaktivität und Berechnung der Ergebnisse wurden, wie oben angegeben, vorgenommen.

Die ermittelte Testosteronkonzentration in ng wurde auf 1 g Testes (Frischgewicht), auf den Gesamthoden und auf den Quotienten g Testes/kg Körpergewicht extrapoliert.

6.) HCG-Stimulation der Testes in vitro

Die Testes wurden unmittelbar nach der operativen Entfernung vom Versuchstier gewogen und in eiskalte physiologische Kochsalzlösung eingebracht. Nach Entfernung der Tunica albuginea wurden von jedem Hoden 3 etwa 50 mg schwere Stücke, deren exaktes Gewicht auf der Mikrowaage bestimmt wurde, entnommen und nach kurzer Spülung mit NaCl in je ein Szintillationsglas überführt, das als Inkubationsgefäss diente und 10 ml Inkubationsmedium enthielt. Als Medium diente Krebs-Ringer-Lösung, zu der 1 mg Glukose/ ml und 1 mg Gammaglobulin/ ml hinzugefügt wurde. Nach einer Vorinkubation von 15 Minuten bei 37° C wurde das Medium aspiriert und verworfen und es wurden erneut 10 ml Medium in die Gläser pipettiert. Dann wurden aus 2 der 3 Gläser je 100 µl entnommen und durch 100 µl einer Lösung von HCG in physiologischer NaCl ersetzt, so dass die endgültige HCG-Konzentration 1250 mIU / ml Inkubat betrug. Der Zeitpunkt des Hinzufügens von HCG wurde als Zeitpunkt Null festgesetzt. Die Gläser wurden mit Sauerstoff begast und mittels

Schraubenverschlusses fest verschlossen. Die Inkubation erfolgte im Schüttelwasserbad mit 40 Bewegungen / Minute bei 37° C. Von der 1. oder 2. Stunde nach HCG-Zugabe an wurden stündlich für insgesamt 6 Stunden Proben für die Testosteronbestimmung entnommen. Nach Probenentnahme wurden die Gläser jeweils wieder mit Sauerstoff begast und verschlossen.

Von den Inkubaten mit HCG wurden zu jedem Zeitpunkt 10 µl entnommen und mit Diluent im Verhältnis 1 : 100 verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 2x 20 bis 100 µl je nach der zu erwartenden Testosteronkonzentration für den Testosteronradioimmunoassay genommen. Von den Kontrollen (d.h. Hodeninkubat ohne HCG) wurden 2 x 100 µl direkt für den Testosteronradioimmunoassay verwandt. Die radioimmunologische Testosteronbestimmung wurde dann ohne weitere Vorreinigung unter Hinzufügen von Antiserum und tritiiertem Testosteron unter Einbeziehung einer Standardkurve wie unter B II, 3b beschrieben, durchgeführt.

Die Ergebnisse wurden als Testosteronproduktion in µg/g Hodengewicht (Frischgewicht) ausgedrückt.

Mit der zur Stimulation gewählten HCG-Konzentration sollte eine möglichst maximale Stimulation erreicht werden. Die in diesen Versuchen eingesetzte HCG-Konzentration lag etwa 10mal über der Dosis, mit der sich in eigenen Vorversuchen und in Experimenten an anderen Tierspezies wie der Ratte (DUFAU et al. 1972) und der Maus (VAN DAMME et al. 1972) eine maximale Stimulierung hatte erreichen lassen.

7.) Halbwertszeit von Testosteron im Plasma nach Kastration

Bei 12 normalen und bei 10 Testosteron-immunisierten Kaninchen, deren Testes für histologische oder biochemische Untersuchungen entfernt wurden, wurde in kurzen Zeitabständen nach der Kastration Blut entweder aus einer Ohrvene oder direkt aus dem Herzen zur Messung der Testosteronkonzentration im Plasma entnommen. Als Zeitpunkt Null wurde hierbei die Unterbindung des linken Funikulus spermaticus festgesetzt, die nie später als 30 Sekunden nach der Unterbindung des rechten erfolgte. Um mit möglichst kleinen Blutmengen (0,5 - 2,0 ml) auszukommen, wurden in diesem Falle ausnahmsweise Blut in heparinisierte Spritzen aufgenommen, da sich so Zellen und Plasma besser trennen liessen. Das Plasma wurde, wie üblich, bei -20° C aufbewahrt und die Bestimmung von Testosteron wie unter B II, 3b angegeben, durchgeführt. Die Konzentrationen wurden in Abhängigkeit von der Zeit semilogarithmisch aufgetragen und die Halbwertszeit wurde von dem flacheren Teil der Kurve graphisch ermittelt.

8.) Zyklisches AMP im Prostatagewebe

Zur Bestimmung des zyklischen AMP (zyklisches Adenosin-3':5'-monophosphat) wurden die akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Prostata, Paraprostata und Samenblasen) freigelegt, von anhängendem Gewebe befreit, gewogen, sofort in flüssige Luft getaucht, über Nacht lyophilisiert und erneut gewogen. Um durch den unterschiedlichen Gehalt an Sekret nicht zu verfälschten Gewichtsangaben zu kommen, wurde das Gewicht nach Lyophilisation als Bezug gewählt. Aus den ge-

friergetrockneten Prostaten wurden etwa 50 mg schwere Gewebsstücke entnommen, in 6 ml Trichloressigsäure für 10 Minuten homogenisiert (nach POTTER, Braun,Melsungen) und bei 800 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurde ein 0,5 ml Aliquot mit 4 x 3 ml Äther ausgeschüttelt bis Reaktion neutral und dann ein Aliquot für den eigentlichen Assay entnommen, der nach WOMBACHER & KÖRBER (1972) durchgeführt wurde und auf dem Prinzip der kompetitiven Proteinbindung basiert.

9.) Sexuelle Aktivität

Die sexuelle Aktivität normaler und Testosteron- oder Oestrogen-immunisierter männlicher Kaninchen wurde 7 - 14 Wochen nach der Immunisierung bestimmt, indem sie für 15 Minuten mit rezeptiven weiblichen Partnern in einem geräumigen Käfig zusammengebracht wurden. Ihr Verhalten wurde beobachtet und Jagen, Besteigen und Ejakulation wurden registriert.

10.) Histologische Methoden

a) Testes

Die Histometrie der Testes wurde wie früher beschrieben, durchgeführt (NIESCHLAG et al. 1973a). Dazu wurden die Testes unmittelbar nach Entfernung und nach Wägung in Bouin'scher Lösung fixiert und anschliessend in Paraplast (Sherwood) eingebettet. Die gesamten Testes wurden in 5 µ dicke Schnitte zerlegt und mit HOPA (Haematoxilin, Orange-G, Phosphomolybdänsäure und Analinblau nach TONNUTTI, 1966) gefärbt. Die Histometrie wurde unter Verwendung eines Okulars von Zeiss (Oberkochem) bei einer Vergrösserung von

320mal vorgenommen. 6000 Treffer von 6 Schnitten aus verschiedenen Ebenen eines jeden Hodens wurden ausgewertet im Hinblick auf

1. Leydig-Zellen
2. Gefässe
3. übriges Interstitium
4. Tubuli contorti (einschl. Keimepithel, Lumen und Wand)
5. Dehiszenzen

Die Resultate wurden als Prozente der gesamten 6000 Treffer angegeben. Das Kernvolumen von 100 Leydig-Zellen eines jeden Hodens wurden nach HERRMANN (1967) bestimmt.

b) Nebennierenrinden

Die Nebennierenrinden wurden sofort nach der Entnahme in Bouin'scher Lösung fixiert und anschliessend in Paraplast (Sherwood) eingebettet. Es wurden jeweils die gesamte linke Nebenniere in 5 µ- Schnitte zerlegt und mit Haematoxilin/Eosin gefärbt. Das Kernvolumen von jeweils 100 Zellen der Zona glomerulosa, fasciculata und reticularis wurde nach HERRMANN (1967) bestimmt. Es wurden nur Zellen der 4 äussersten Schichten als glomerulosa Zellen angesprochen, um Schwierigkeiten bei der Identifizierung zu vermeiden. Da weder das Gewicht noch die Breite der 3 Zonen der Nebennierenrinde ein verlässliches Mass für die Aktivität dieser Drüse sind, verliessen wir uns ganz auf den eindeutigeren, wenn auch mühsamer zu erstellenden Parameter des Kernvolumens.

c) Akzessorische Geschlechtsdrüsen

Die akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Prostata, Para-

prostata und Samenblasen) wurden präpariert und in toto fixiert, mit Haematoxilin/Eosin gefärbt und histologisch beurteilt.

III Substanzen und Reagenzien

Tritiierte Steroide (NEN-Chemicals, Dreieichenhain) wurden nach Reinigung auf Dünnschichtchromatographie verwandt: Hydrocortison-(1,2-^{3}H) (Spezifische Aktivität 0,25 mCi/1,56 µg), D-Aldosteron-(1,2-^{3}H) (0,25 mCi/1,67 µg), Testosteron-(1,2-^{3}H) (0,25 mCi/1,6 µg), Adrost-4-en-3,17-dion-(1,2-^{3}H) (0,25 mCi/1,56 µg), Dihydrotestosteron-(1,2-^{3}H) (0,25 mCi/1,65 µg), Dehydroepiandrosteron-(7-^{3}H) (0,25 mCi 3,43 µg) und Oestradiol-17ß-(6,7-^{3}H) (0,25 mCi/1,8 µg). Unmarkierte Steroide und alle anderen Substanzen und Reagenzien wurden von der Merck AG (Darmstadt) bezogen, wenn nicht anders im Text oder in den zitierten Literaturstellen angegeben.

C. Ergebnisse

I. Produktion von Antiseren

Die Ergebnisse der Immunisierung mit dem einmaligen, intradermalen Verfahren, das in der vorliegenden Studie angewandt wurde, sind in Abb. 6 zusammengefasst. Von den 128 Kaninchen, die entweder zum Studium der biologischen Effekte der Immunisierung gegen Steroidhormone oder zur Gewinnung von Antiseren für die im Rahmen dieser Studie angewandten Radioimmunoassays immunisiert wurden, entwickelten 86 % so gute Titer, dass sie in Radioimmunoassays Verwendung finden konnten (oder könnten). 8 % entwickelten schlechte Antiserum-Titer, d.h. unter 1 : 1000, die zwar für einen Radioimmunoassay nicht ausreichend wären, jedoch zu messbaren funktionellen und morphologischen Veränderungen im Versuchstier führten. Nur 6 % entwickelten überhaupt keine Antikörper oder verstarben vor der ersten Untersuchung.

Hohe Antiserum-Titer konnten bereits 3 Wochen nach Immunisierung beobachtet werden. Von 24 Tieren, deren Seren zu diesem frühen Zeitpunkt untersucht wurden, hatten 11 bereits Titer zwischen 1 : 1000 und 1 : 10000 entwickelt. und weitere 7 sogar Titer über 1 : 10000. Gewöhnlich werden höchste Titer 4 - 8 Wochen nach der Immunisierung erreicht, wie auch an den Beispielen in Abb. 7 gesehen werden kann. Es könnten jedoch grössere Schwankungen des Titers innerhalb desselben Tieres beobachtet werden und die Entwicklung ist nicht immer vorhersagbar. Die meisten Tiere, die über längere Zeiträume beobachtet wurden, hatten gute Titer für einige Monate, bis zu einem Jahr, manchmal sogar länger.

Während der ersten 4 Wochen nach der Immunisierung können die Tiere Entzündungen und Ulzerationen an den intradermalen Injektionsstellen entwickeln, die hauptsächlich als Folge der Tbc-Bakterien-Konzentration in der zur Immunisierung verwandten Emulsion anzusehen sind. Die Tuberkelbakterien sind essentiell für ein gutes Ergebnis der Immunisierung, wie Versuche mit niedrigeren Konzentrationen gezeigt haben. Die Tiere machen jedoch nicht den Eindruck, unter den lokalen Entzündungen zu leiden, und als objektiver Masstab kann ihre Gewichtszunahme (Abb. 8) und ihre Mortalität angeführt werden, die sich nicht von denen normaler Tiere unterscheiden.

Alle hier mitgeteilten morphologischen und funktionellen Untersuchungen wurden in der 1. - 14. Woche nach der Immunisierung durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung lagen die Titer der mit Cortisol immunisierten Tiere zwischen 1 : 1000 und 1 : 2500 und die der mit Aldosteron immunisierten zwischen 1 : 500 und 1 : 700. Die Titer der übrigen untersuchten Tiere lagen zwischen 1 : 5000 und 1 : 100000.

Der Höhe des Antiserum-Titers, der für die Qualität eines Radioimmunoassays mitentscheidend ist, kommt bei der Entwicklung der biologischen Effekte des Antiserums keine wesentliche Bedeutung zu. Vorausgesetzt, dass überhaupt Antikörper vorhanden waren, fanden wir keine Korrelation zwischen dem Titer und den morphologischen und funktionellen Veränderungen. Deshalb werden bei den folgenden Ergebnissen die Titer nicht immer im einzelnen mit angegeben werden.

II. Effekt der aktiven Immunisierung mit Testosteron auf Funktion und Morphologie der Testes

1. Konzentration und prozentuale Bindung von Testosteron im Serum

Wie aus Tab. 3 hervorgeht, ist die Testosteronkonzentration im Serum Testosteron-immunisierter Tiere bis etwa 100fach höher als die normaler männlicher Kaninchen. D.h., die Konzentrationen sind aus dem ng-Bereich in den µg-Bereich gestiegen, also in Konzentrationen, die sonst nur bei einigen Corticosteroiden im Organismus physiologischerweise gefunden werden können.

Gleichzeitig aber ist auch die prozentuale Bindung von Testosteron, die bei den normalen Tieren 90 ± 1,5 % beträgt, auf nahezu 100 % angestiegen. Es muss hierbei vermerkt werden, dass die Präzision der hier verwandten Methode zur Bestimmung der prozentualen Bindung eine exakte Unterscheidung im Bereich zwischen 99 und 100 % nicht zulässt.

2. Sexuelle Aktivität

Trotz der hohen zirkulierenden Androgenkonzentrationen verlieren die Testosteron-immunisierten männlichen Kaninchen ihre sexuelle Aktivität, wie die in Tab. 4 zusammengefassten Versuchsergebnisse zeigen. Während normale und Oestrogen-immunisierte Kaninchen in der 15-minütigen Beobachtungszeit ihre weiblichen Partner jagten, etwa 10 - 15 mal bestiegen und schliesslich ejakulierten, hatten die Testosteron-immunisierten Kaninchen keinerlei Interesse an den potentiellen Partnerinnen. Da sich das Verhalten der

Oestrogen-immunisierten Tiere nicht von dem der normalen unterschied, kann das Desinteresse nicht durch die Immunisierung als solche verursacht sein, sondern ist als spezifischer Effekt der Immunisierung gegen Testosteron zu betrachten.

3. Akzessorische Geschlechtsdrüsen

Als weiterer Parameter für die biologische Aktivität von Testosteron im immunisierten Tier können die Befunde an den akzessorischen Geschlechtsdrüsen herangezogen werden.

Die Gewichte der akzessorischen Geschlechtsdrüsen der Testosteron-immunisierten Tiere lagen um etwa 1/3 niedriger als das der normalen Tiere (Tab. 5). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p > 0,05$).

Diese Atrophie kam auch im histologischen Bild zum Ausdruck. Das Prostataepithel der Testosteron-immunisierten Tiere war atrophiert und der Durchmesser der Lumina vermindert. In der Samenblase war das Epithel ebenfalls atrophisch und die Falten waren reduziert (Abb. 9a & b).

Die Konzentration des zyklischen AMP im Prostatagewebe war im Vergleich zu den Kontrollen etwa um ein Drittel reduziert (Tab. 5). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p > 0,05$).

Oestrogen-immunisierte Tiere dagegen unterschieden sich weder im Hinblick auf das Gewicht noch die Morphologie noch die zyklische AMP-Konzentration signifikant von den Kontrolltieren (Tab. 5).

4. Morphologie der Testes

Bei 4 normalen und 8 Testosteron-immunisierten Kaninchen wurden sämtliche unter B II 10a aufgeführten morphologischen Parameter untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengestellt. Dabei fällt vor allem die Zunahme des testikulären Gewichtes und der Anzahl der Leydig-Zellen auf. Aber nicht nur die Zahl der Leydig-Zellen hat zugenommen, sondern auch ihr Kernvolumen. Ferner findet sich eine vermehrte Vaskularisation der Testes. Beispiele dieser morphologischen Befunde zeigen die Abb. 10a & b.

5. Testikuläre Testosteron-Konzentration

In den Testes hat nicht nur die Zahl der Leydig-Zellen zugenommen, sondern auch der Testosterongehalt, wie aus Abb. 11 hervorgeht. Bezogen auf die Gewichtseinheit Frischgewicht hat die Testosteronkonzentration demnach im Mittel um das 2,6fache und bezogen auf den Gesamthoden um das 3,3fache zugenommen.

6. Stimulierbarkeit der Testes durch HCG

Bei der in vitro Stimulation von Testesgewebe mit HCG ergaben sich signifikante Unterschiede für normale und für Testosteron-immunisierte Kaninchen (Abb. 12). Bezogen auf den Wert, der 6 Stunden nach Beginn der Stimulation erzielt wurde, war die Testosteronproduktion pro 1 g Testesgewebe mit 16,73 $\pm$ 3,56 µg bei den immunisierten Tieren etwa doppelt so hoch, wie bei den normalen Tieren, die eine Produktion von 8,14 $\pm$ 2,31 µg zeigten ($p > 0{,}001$).

7. Halbwertszeit von Testosteron in der peripheren Zirkulation

Einige Beispiele der Elimination von Testosteron aus dem peripheren Plasma normaler und Testosteron-Immunisierter Kaninchen nach Kastration werden in Abb. 13 gezeigt. Die sich aus der graphischen Darstellung ergebenden Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) von Testosteron im peripheren Plasma 12 normaler und 10 Testosteron-immunisierter männlicher Kaninchen ist in Tab. 7 aufgeführt. Demnach ist nicht nur die Testosteronkonzentration im peripheren Blut der immunisierten Tiere, wie bereits oben angeführt erhöht, sondern die Halbwertszeit ist ebenfalls um im Mittel das 2,5fache verlängert (16,9 $\pm$ 5,3 gegen 46,2 $\pm$ 19,3 Minuten).

III. Einfluss der aktiven Immunisierung mit verschiedenen Androgenen, Oestrogenen und Corticosteroiden auf Funktion und Morphologie der Testes und der Nebennierenrinde

Zu dieser Studie wurden insgesamt 8 Gruppen 12 Wochen alter männlicher Kaninchen mit Testosteron, 5α-Dihydrotestosteron, 5ß-Dihydrotestosteron, Androstendion, Dehydroepiandrosteron, Oestradiol, Cortisol und Aldosteron immunisiert. Bei der Untersuchung der Tiere mit den höchsten Antikörper-Titern (1 - 4 per Gruppe) 7 - 14 Wochen nach der Immunisierung wurden folgende Ergebnisse erzielt.

1. Morphologie der Testes

Wie die mit Testosteron-immunisierten Tiere zeigten auch die mit 5α-Dihydrotestosteron, 5ß-Dihydrotestosteron, Cortisol und Androstendion immunisierten Kaninchen eine

Hyperplasie der Leydig-Zellen (Abb. 14), eine Zunahme der Kernvolumina der Leydig-Zellen von 128 ± 4 μ^3 auf 146 bis 254 μ^3 (Abb. 15) und eine Zunahme der Hodengewichte (Abb. 16). Die mit Oestradiol immunisierten Tiere hatten eine vermehrte Zahl von Leydig-Zellen und ein vergrössertes Kernvolumen, aber keine Zunahme der Hodengewichte. Eine Änderung des Gewichtes und der Morphologie der Testes der mit Aldosteron und Dehydroepiandrosteron immunisierten Tiere wurde nicht beobachtet.

Der histometrisch ermittelte Anteil des tubulären Gewebes blieb bei immunisierten und Kontrolltieren derselbe, nämlich 74 ± 1,5 % ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). Unter Berücksichtigung des hohen Gewichtes kann daher angenommen werden, dass das tubuläre Gewebe bei allen den Tieren einen Zuwachs erfahren hat, die eine Zunahme des Hodengewichtes zeigten, d.h., dass alle Tiere mit Leydig-Zell-Hyperplasie eine gleichzeitige Zunahme des tubulären Gewebes zeigten. Eine Ausnahme bildeten die mit Oestradiol immunisierten Tiere, die nur eine Zunahme der Leydig-Zellen, aber nicht der Tubuli aufwiesen.

2. Morphologie der Nebennierenrinden

Bei den normalen Tieren betrug das Kernvolumen der Glomerulosa-Zellen 117 ± 4 μ^3 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$), das der Fasciculata-Zellen 116 ± 5 μ^3 und das der Reticularis-Zellen 89 ± μ^3. Die mit Cortisol, Aldosteron und Dehydroepiandrosteron immunisierten Kaninchen zeigten einen signifikanten Anstieg des Kernvolumens der Glomerulosa-Zellen auf 163 - 194 μ^3 (Bereich). Das Kernvolumen der Fasciculata-Zellen war ebenfalls bei den mit Cortisol immunisierten Tieren vergrössert (159 - 160 μ^3), war aber nur in je

einem der mit Aldo und Dehydroepiandrosteron immunisierten Kaninchen erhöht (123 - 153 μ^3). Bei keinem dieser Tiere fanden sich Änderungen der Zona reticularis. Alle drei adrenalen Zonen der mit Androstendion und Oestradiol immunisierten Tiere zeigten keine Unterschiede gegenüber den Normaltieren (Abb. 17).

3. Funktion von Testes und Nebennierenrinden

Ein Überblick über die Tab. 8 - 10 aufgeführten biochemischen Daten ergibt das folgende allgemeine Bild: Soweit es möglich war, die verschiedenen Steroide zu messen, zeigten alle Tiere 2 - 100fach erhöhte Serumkonzentrationen des Steroids, gegen das sie immunisiert worden waren (Tab. 2). In einigen Fällen waren auch die Konzentrationen anderer Steroide erhöht. Die prozentuale Bindung des jeweiligen immunogenen Steroids war ebenfalls stark erhöht, in einigen Fällen auf nahezu 100 % (Tab. 9). Die Antiseren entwickelten ihre höchste Affinität gegen das jeweilige immunogene Steroid (Tab. 10). Die Ausnahme darin bildeten die mit 5α-Dihydrotestosteron und 5ß-Dihydrotestosteron immunisierten Tieren, deren Seren die höchste Affinität gegenüber Testosteron zeigten. Die Messung der Gonadotropine ergab, dass keines der Tiere, insbesondere keines der Tiere mit hohen Gesamtkonzentrationen von Testosteron und Oestradiol niedrige LH- oder FSH-Werte hatten. Im Gegenteil, die meisten Tiere mit Leydig-Zell-Hyperplasie und vermehrtem tubulärem Gewebe zeigten eine Erhöhung von LH und FSH. Die LH-Werte der mit Oestradiol immunisierten Tiere lagen über, die FSH-Werte im Normalbereich.

Bei den meisten Tieren war die prozentuale Bindung im Serum nicht nur für das jeweilige immunogene Steroid

erhöht, sondern auch für andere Steroide (Tab. 9). Beispielsweise war die prozentuale Bindung von Testosteron in den mit Cortisol immunisierten Tieren auf 95,6 % angestiegen. Entsprechend fand sich auch eine relativ hohe Kreuzreaktion des Cortisol-Antiserums mit Testosteron (7,5 %). Jedoch verhielten sich prozentuale Bindung und Kreuzreaktion nicht immer parallel. So war z.B. die prozentuale Bindung von Oestradiol bei allen immunisierten Tieren leicht erhöht, obwohl sich in den meisten Antiseren eine Kreuzreaktion gegenüber Oestradiol nicht nachweisen liess (Tab. 10).

D. Diskussion

I. Neutralisation der biologischen Aktivität von Steroiden durch Antikörper

Entsprechend den vorliegenden Befunden bewirkt die aktive Immunisierung mit Testosteron im männlichen Tier einen Verlust der sexuellen Aktivität, eine Atrophie der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, eine Verlangsamung des Testosteronmetabolismus und eine Erhöhung der Gonadotropinsekretion. Diese biologischen Effekte der aktiven Immunisierung mit Testosteron kommen denen einer Kastration gleich, die entsprechend ihrer Genese als "immunologische Kastration" bezeichnet werden könnte. Paradoxerweise besteht aber gleichzeitig eine Hyperplasie der Leydig-Zellen in den Testes. Eine derartige Hyperplasie kann durch die exogene Administration von HCG erreicht werden (SCHOEN & SAMUELS 1965) und wurde ebenfalls nach der Administration von Cyproteron beobachtet (MIETKIEWSKI & LUKASZYK 1969; HEINERT & TAUBERT 1973). Die Leydig-Zell-Hyperplasie im Falle des Cyproteron ist ebenfalls durch eine vermehrte Gonadotropinstimulation zu erklären, die als Reaktion des Hypothalamus-Hypophysen-Systems auf die Besetzung der androgensensiblen Rezeptoren durch das Antiandrogen Cyproteron zu betrachten ist. Die Ursache für die von uns beobachteten Effekte im Testosteron-immunisierten Tier ist in einer Neutralisation endogenen Testosterons durch den Antikörper zu suchen.

Seit der Untersuchung von SLAUNWHITE et al. (1962) wird angenommen, dass nur das freie, nicht an Proteine gebundenes Steroid im zirkulierenden Blut biologisch aktiv ist, während das Protein-gebundene eine Art Transport- und Depotform darstellt. Eine weitere Bestätigung erfuhr diese Hypothese durch die Untersuchungen von KAWAI & YATES (1968).

Steroide werden dabei mit geringer Affinität und relativ unspezifisch an Albumin gebunden und darüber hinaus unter hoher Affinität an spezifische Proteine, die als "Transcortin " für Cortisol und "TeBG" (testosterone binding globulin) für Testosteron identifiziert wurden. Durch die Immunisierung gegen Testosteron wird ein weiteres, sehr spezifisches Testosteron-bindendes Globulin mit hoher Affinität, nämlich der Antikörper, in die periphere Blutbahn eingeführt. Die Bindungsaffinität für Testosteron der verschiedenen Proteine sind in Tab. 11 gegenübergestellt. Während entsprechend unseren eigenen Untersuchungen und denen von CORVOL & BARDIN (1973) unter normalen Bedingungen beim Kaninchen ungefähr 90 % des zirkulierenden Testosterons an Proteine gebunden sind, sind es im immunisierten Tier nahezu 100 %. Diese hohe Bindung hat zur Folge, dass das zirkulierende Testosteron nur schwer oder gar nicht an die Rezeptoren der Zellen in den Zielorganen, deren Affinität in vivo ungefähr in derselben Grössenordnung wie die der Antikörper liegt (JUNGBLUT, persönl. Mitteilung), abgegeben werden kann und somit keine biologische Aktivität mehr entfalten kann.

Als Beweis für die Richtigkeit dieser Hypothese kann die Atrophie der akzessorischen Geschlechtsdrüsen in den Testosteron-immunisierten Tieren betrachtet werden. Die Konkurrenz von Antikörper und Rezeptor um das Steroid spielt sich aber nicht nur an peripheren Zielorganen, sondern auch an den übergeordneten Zentren ab, wie aus der vermehrten Gonadotropinsekretion geschlossen werden kann. Damit greift der Antikörper als Störgrösse in den Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Testes ein. Wie in Abb. 18 schematisch dargestellt ist, registrieren die zentralen Rezeptoren im Testosteron-immunisierten Tier trotz starker Erhöhung der Testosterongesamtkonzentration

im Blut einen Testosteronmangel und reagieren in adäquater Weise mit einer vermehrten LH-Inkretion. Die Leydig-Zellen antworten auf die vermehrte LH-Stimulation mit vermehrter Hormonproduktion, die wiederum nur durch Hypertrophie und Hyperplasie der Zellen aufrechterhalten werden kann. Da das neu und vermehrt gebildete Hormon jedoch wieder durch Antikörper abgebunden wird, bleiben Hypertrophie und Hyperfunktion im biologischen Sinne frustran (NIESCHLAG et al. 1973b).

Unsere Befunde und die daraus gezogenen Schlüsse erhalten Unterstützung durch die inzwischen veröffentlichten Untersuchungen von HILLIER et al. (1973), die bei männlichen Ratten nach aktiver Immunisierung mit Testosteron ebenfalls eine vermehrte Konzentration und Bindung des Testosterons im Blut, sowie einen Anstieg des LH und des FSH beobachteten. Analog zu den Befunden im männlichen Tier fanden in jüngster Zeit FERIN et al. (1974a) bei weiblichen, mit Oestradiol immunisierten Rhesusaffen einen LH-Anstieg. Unsere Untersuchungen und die der zuletzt zitierten Autoren zeigen also, dass die biologische Aktivität von Androgenen und Oestrogenen durch <u>aktive</u> Immunisierung neutralisiert werden kann.

Wie bereits eingangs erwähnt, wurde die Möglichkeit der immunologischen Neutralisierung von Steroiden bereits früher untersucht. So zeigten LIEBERMAN et al. (1959) in ihrer ersten Studie, dass die Wirkung von Testosteron auf die Prostata kastrierter Ratten durch die gleichzeitige Injektion eines Testosteron-Antiserums vom Kaninchen verhindert werden kann. Aus derselben Gruppe wurden später Befunde vorgelegt (NERI et al. 1964), die zeigten, dass im Versuchstier der eosinopenische Effekt des Cortisols, der Einfluss des Aldosterons auf den Na/K-Quotienten und der anabole Effekt des Testosterons auf den M. levator ani

durch die gleichzeitige Administration eines entsprechenden Antiserums verhindert werden konnte. Die dann in den letzten 10 Jahren veröffentlichten Untersuchungen, die Antikörper gegen Steroide in physiologischen Studien einsetzten, befassten sich ausschliesslich mit Problemen der Reproduktionsforschung und hier vorwiegend mit denen im weiblichen Organismus. Von den Studien, die sich mit dem männlichen Tier befassen, ist neben den bereits erwähnten noch die von GOLDMANN et al. (1972) von Interesse. Diese Autoren zeigten, dass Antikörper gegen Testosteron auch diaplazentar ihre Wirkung entfalten können. Wenn nämlich gravide Ratten passiv gegen Testosteron immunisiert wurden, konnte die sexuelle Differenzierung männlicher Foeten blockiert werden und es kam zu einer Reduktion des anogenitalen Abstandes und des Testesgewichtes, während die sexuelle Entwicklung weiblicher Foeten nicht gestört wurde. Daraus konnte ein Beweis dafür abgeleitet werden, dass in den foetalen Testes produziertes Testosteron für die Entwicklung und Transformation der anlagemässig bisexuellen äusseren Genitalien zum männlichen hin verantwortlich ist.

Zahlreicher als die mit männlichen sind die mit weiblichen Versuchstieren vorgenommenen Experimente, die sich der Immunisierung mit Steroiden als Forschungsmethode bedienten. Es konnte gezeigt werden, dass der uterotrophe Effekt von Oestradiol, der direkt durch die Administration von Oestradiol oder indirekt durch die Gabe von HCG herbeigeführt werden kann, durch die gleichzeitige Verabreichung eines Oestradiol-Antiserums verhindert werden kann (NERI et al. 1964; ERKE & FOOT 1972). Durch passive Immunisierung mit Oestradiol konnte in Ratten (FERIN et al. 1969) und in Hamstern (CALDWELL et al. 1970) die Ovulation unterdrückt werden. Der Grund hierfür ist in einer Neutra-

lisation der Oestrogene zu suchen, die am Ende der Follikelphase ansteigen und dadurch den mittzyklischen LH-Peak induzieren, der zur Ovulation führt. Ebenso konnte der Oestradiol-induzierte mittzyklische Prolaktin-Peak durch passive Immunisierung mit Oestradiol verhindert werden (NEILL et al. 1971). Wie bei kleinen Nagern, so konnte auch in Primaten (Rhesusaffen), die Ovulation durch aktive Immunisierung durch Oestrogenen verhindert werden (COWCHOCK et al.1972; SUNDARAM et al.1973; FERIN et al. 1974a). In einer Studie, die sich mit dem Einfluss der Catecholamine auf die Gonadotropinsekretion befasste, konnte gezeigt werden, dass die Effekte der Catecholamine durch Oestrogene vermittelt werden. Denn die in unbehandelten Versuchstieren durch intraventrikuläre Injektion von l-DOPA und Epinephrin herbeizuführende Ovulation konnte im Oestrogen-immunisierten Tier nicht ausgelöst werden (RAZIANO et al. 1971; FERIN et al. 1974b). Schliesslich konnte durch passive Immunisierung mit Progesteron die Implantation von Ova im Uterus verhindert und in graviden Tieren konnten Aborte induziert werden (RAZIANO et al. 1972).

Alle bisher beschriebenen biologischen Effekte der Immunisierung gegen Steroide beruhen auf demselben Prinzip, nämlich der Neutralisation des Steroids durch den Antikörper. Wie bereits eingangs erwähnt, können nicht nur Steroid- sondern auch Proteohormone auf diese Weise immunologisch inaktiviert werden. Einige Beispiele seien zur Illustration angeführt.

Am längsten bekannt ist die Neutralisation des Insulins durch Antikörper. Im Versuchstier kann so experimentell ein Diabetes erzeugt werden (ARMIN et al. 1960; WRIGHT 1961,

GRODSKY et al. 1966). In der Klinik wird die Inaktivierung des Insulins durch Antikörper als "Insulinresistenz" bei der Behandlung des Diabetes mellitus von Bedeutung (Übersicht bei FEDERLIN 1971). Es sind jedoch auch vereinzelte Fälle beschrieben worden, wo sich Antikörper gegen Insulin im Patienten entwickelt haben, die nachweislich nie mit Insulin behandelt worden waren, wo es also zu einer spontanen Antikörperbildung gekommen ist (FØLLING & NORMAN 1972; HIRATA et al. 1973). In ähnlicher Weise wie im Falle des Insulins kann die Therapie mit Wachstumshormon (ILLIG 1970) oder mit ACTH (FLEISCHER et al. 1967; LANDON et al. 1967; GLASS & DALY 1971) durch die Entwicklung von Antikörpern gegen diese Hormone beeinträchtigt werden.

Die Immunisierung mit LH führt im weiblichen Organismus zu einer Unterdrückung der Ovulation, zu einer Verminderung der Progesteronsekretion aus den Ovarien und zur Infertilität (LAWRENCE & ICHIKAWA 1968; TALAAT & LAWRENCE 1969; MADHWA RAJ & MOUDGAL 1971). Bei männlichen Versuchstieren führt die Immunisierung gegen Gonadotropine zur Atrophie der Testes mit entsprechenden Folgen, wie Infertilität und Androgenmangel (HAYASHIDA 1963; QUARI et al. 1966; PINEDA et al. 1967; TALAAT & LAWRENCE 1971). In jüngster Zeit gelang es FRASER & GUNN (1973) und ARIMURA et al. (1973) durch Immunisierung gegen LH-RH eine Atrophie der Testes herbeizuführen.

II. Aktive Immunisierung mit Steroiden als Methode zum Studium endokriner Feedback-Kontrollmechanismen

Die eigenen und die aus der Literatur zitierten Ergeb-

nisse geben genügend Beweise dafür, dass endogene und exogene Hormone durch aktive oder passive Immunisierung neutralisiert werden können. Eine Absicht der vorliegenden Untersuchung war es, diese Möglichkeit der Neutralisierung von Steroiden durch aktive Immunisierung zum Studium hypothalamo-hypophysär-gonadaler und -adrenaler Feedback-Kontrollmechanismen zu verwenden. Denn wenn die biologische Aktivität eines Steroids durch Antikörper inaktiviert werden kann, dann sollte es auch möglich sein, die Rolle eines bestimmten Steroids im Feedback-System durch aktive Immunisierung zu klären. Denn während bei den klassischen Experimenten die Gonaden und die Nebennieren und damit das gesamte Steroidspektrum entfernt werden und das zu untersuchende Steroid exogen hinzugefügt wird, bleibt das Tier bei den immunologischen Experimenten intakt und es wird durch Bindung an den Antikörper nur das Steroid eliminiert, gegen das immunisiert worden ist. Wenn dieses Steroid normalerweise eine Wirkung im Feedback-System hat, dann sollte eine Elimination eine Reaktion des Hypothalamo-hypophysären Systems bewirken, die in der Peripherie messbar wird.

Entsprechend diesen Überlegungen bestätigen unsere immunologischen Untersuchungen die bekannte Rolle des Testosterons im Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Testes. Aus weiteren Ergebnissen der vorliegenden Studie könnte aber auch der Schluss gezogen werden, dass Androstendion oder Cortisol in diesem Regelkreis von Bedeutung sind. Ein derartiger Schluss ist aber ohne vorherige Prüfung der Spezifität des Antiserums und der prozentualen Bindung der Steroide in diesem Serum nicht möglich. Der Spezifität des Antiserums, die bei Radioimmunoassays <u>in vitro</u> eine entscheidende Rolle spielt, kommt auch

bei unseren in vivo-Untersuchungen grösste Bedeutung zu, wie an den folgenden Beispielen erörtert wird.

Die Antiseren der mit 5α- oder 5ß-Dihydrotestosteron immunisierten Tiere entfalten ihre höchste Affinität gegenüber Testosteron, so dass nicht entschieden werden kann, ob die beobachteten Veränderungen in diesen Tieren dem Effekt der Neutralisation von Testosteron, 5α-Dihydrotestosteron oder 5ß-Dihydrotestosteron zuzuschreiben ist. Die Antwort auf diese Frage wäre von besonderem Interesse gewesen, da 5α-reduzierte Androgene anscheinend eine aktivere Rolle in der Feedback-Kontrolle der Testes spielen als Testosteron selbst, wie aus einer kurzen Mitteilung von ZANISI et al. (1973) hervorgeht.

In ähnlicher Weise zeigen die Antiseren der Kaninchen, die gegen Cortisol oder Androstendion immunisiert worden sind, eine relativ hohe Kreuzreaktion gegenüber Testosteron und gleichzeitig eine hohe prozentuale Bindung von Testosteron im Serum. Daher muss angenommen werden, dass die erhöhten Gonadotropine und die Hyperplasie und Hyperfunktion der Testes dieser Tiere nicht durch die biologische Neutralisation von Androstendion oder Cortisol sondern der von Testosteron bewirkt wird.

In diesen Fällen wird also der Aussagewert der immunologischen Methode zur Überprüfung endokriner Regelkreise durch die Spezifität der Antiseren limitiert. Die Verwendung von Steroidkonjugaten, die über eine Koppelung am Ring B gewonnen wurden, wie sie kürzlich für Testosteron und Androstendion von WEINSTEIN et al. (1972) hergestellt wurden, wird eindeutigere Resultate mit dieser Methode liefern, da so sehr spezifische Antiseren produziert werden können.

In unseren jetzigen Versuchen stand uns lediglich ein "B-Konjugat" zur Verfügung, nämlich das von Oestradiol. Die Daten über die Spezifität und prozentuale Bindung der Seren der mit diesem Konjugat immunisierten Tiere lassen den eindeutigen Schluss zu, dass Oestradiol eine spezifische Rolle in der Feedback-Kontrolle der Testes spielt. Die erhöhten LH-Werte und die Leydig-Zell-Hyperplasie dieser Tiere kann nicht durch Kreuzreaktion mit Androgenen erklärt werden, sondern muss der Neutralisation von Oestradiol zugeschrieben werden. Die in vitro ermittelte Spezifität des Oestradiol-Antiserums wird auch durch den in vivo erhobenen Befund ergänzt, dass die akzessorischen Geschlechtsdrüsen der mit Oestradiol immunisierten Tiere im Gegensatz zu den mit Testosteron immunisierten keine morphologischen Veränderungen zeigen.

Da bei den mit Oestradiol immunisierten Tieren nur LH, nicht aber FSH erhöht ist und da nur eine Vermehrung der Leydig-Zellen, nicht aber der Tubuli beobachtet wird, liegt die Vermutung nahe, dass Oestradiol einen unterschiedlichen Effekt auf die LH- und die FSH-Sekretion ausübt. Die geringe Zahl der untersuchten Tiere lässt zwar noch keinen endgültigen Schluss zu, die Beobachtung steht jedoch im Einklang mit dem Befund, dass bei kastrierten männlichen Ratten Oestradiol in niedrigen Dosen LH, nicht aber FSH supprimiert (MARTINI 1973). Dieser differente Effekt scheint in den einzelnen Spezies jedoch nicht identisch zu sein. So fanden KULIN & REITER (1972), dass Oestradiol in niedrigen Dosen die FSH-, nicht aber die LH-Sekretion normaler Männer unterdrückt.

Die durch aktive Immunisierung mit Cortisol, Aldosteron oder Dehydroepiandrosteron herbeigeführten morphologischen und funktionellen Veränderungen der Nebennierenrinde gleichen durch ACTH-Stimulation herbeigeführten Veränderungen. Die Daten über Steroidkonzentrationen, prozentuale Bindung und Spezifität machen es wahrscheinlich, dass den Veränderungen an den Nebennieren derselbe pathogenetische Mechanismus zugrunde liegt, wie denen an den Testes. Für den hypothalamo-hypophysär-adrenalen Regelkreis bedeutet das, dass die sezernierten Corticosteroide von den durch aktive Immunisierung induzierten, zirkulierenden Antikörper gebunden und daher unerreichbar für zentrale Rezeptoren werden. Trotz der hohen Gesamtkonzentration im Serum registriert das Hypothalamo-Hypophysen-System daher einen Mangel an Corticosteroiden und reagiert darauf in adäquater Weise mit einer vermehrten ACTH-Serkretion, die zu einer Stimulation der Nebenierenrinde führt. Das fehlende Glied in der Folge von Beweisen für die Richtigkeit dieser Hypothse sind die tatsächlichen ACTH-Konzentrationen im Serum der immunisierten Tiere. Geeignete Bestimmungsmethoden standen uns zum Zeitpunkt der Untersuchung jedoch nicht zur Verfügung.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen über die Effekte der aktiven Immunisierung mit Steroiden auf den hypothalamo-hypophysär-adrenalen Regelkreis müssen ebenfalls unter Berücksichtigung der Spezifität und prozentualen Bindung interpretiert werden. Die bei den mit Cortisol immunisierten Tieren beobachteten Veränderungen können durch eine erhöhte Bindung sowohl von Cortisol wie von Corticosteron verursacht sein, denn die Antiseren dieser Tiere zeigen für beide Steroide eine hohe Affinität und Bindung. Da beim Kaninchen Corticosteron das Hauptprodukt der Nebennierenrinde ist

(BUSH 1953), liegt die Vermutung nahe, dass die vermehrte Bindung dieses Steroids von entscheidenderer Bedeutung ist.

Die Antiseren der mit Dehydroepiandrosteron immunisierten Tiere sind sehr spezifisch für Dehydroepiandrosteron oder zumindest für Δ^5-3ßOH-Steroide (NIESCHLAG et al. 1972). Diese Seren zeigen auch keine vermehrte Bindung von Cortisol oder Corticosteron. Daher erscheint die verstärkte Aktivität der Nebennierenrinden dieser Tiere durch eine vermehrte ACTH-Sekretion bedingt zu sein, die als Reaktion auf die Neutralisation von Dehydroepiandrosteron oder eines verwandten Δ^5-3ßOH-Steroids aufzufassen ist. Unseres Wissens war es bisher nicht bekannt, dass Δ^5-3ßOH-Steroide von regulativem Einfluss in der Feedback-Kontrolle der Nebennierenrinde sein können.

Die Faktoren, die die Aldosteron-Sekretion der Nebennierenrinden kontrollieren, sind noch Gegenstand im Gange befindlicher Diskussion. Untersuchungen, die eine Einflussnahme des Hypothalamus-Hypophysen-Systems wahrscheinlich machen, blieben nicht unwidersprochen (Übersicht bei GLAZ & VECSEI 1971). Die Daten von den mit Aldosteron immunisierten Tieren unserer Studie können im Sinne einer Unterstützung des Konzeptes interpretiert werden, wonach ACTH - neben anderen Faktoren - die Aldosteron-Sekretion kontrollierend beeinflusst. Unsere Untersuchungen werden durch die von GLESS et al. (1974) ergänzt, die zusätzlich zu dem von uns gemessenen Anstieg der prozentualen Bindung von 27 % im normalen auf 95 % im Aldosteron-immunisierten Tier einen bis 30fachen Anstieg der Gesamtkonzentration von Aldosteron im Serum Aldosteron-immunisierter Tiere fanden.

Letztlich demonstrieren die Befunde der mit Aldosteron bzw. Dehydroepiandrosteron immunisierten Tiere, dass die bei den übrigen Tieren beobachteten Veränderungen der Testes nicht als ein unspezifischer Effekt des Immunisierungsvorganges mit Freund'schem Adjuvans, sondern als spezifische Folge der Neutralisation von Steroidhormonen zu betrachten sind.

Zum Abschluss dieses Kapitels kann festgestellt werden, dass die Aussagekraft der immunologischen Methode zur Überprüfung der Regelkreise zwischen Hypothalamus und Hypophyse einerseits und den Testes bzw. der Nebennierenrinde andererseits im wesentlichen von der Spezifität der im Versuchstier erzeugten Antikörper abhängt. Die Verwendung neuer Steroidkonjugate, mit denen spezifischere Antikörper produziert werden können und an deren Entwicklung gegenwärtig gearbeitet wird, wird die Methode erweitern und bereichern. Anhand der hier vorgestellten ersten Versuche mit dieser Methode kann jedoch der zugrundeliegende prinzipielle Wirkungsmechanismus demonstriert werden. Zuletzt sei daran erinnert, dass die Methode nicht nur auf das Studium der beschriebenen Regelkreise begrenzt bleiben muss, sondern auf andere übertragbar ist, wie beispielsweise entsprechende Versuche im Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Schilddrüse gezeigt haben (NIESCHLAG et al. 1973c).

III. Charakterisierung der biologischen Effekte der aktiven Immunisierung gegen Testosteron

Die Effekte der aktiven Immunisierung gegen Testosteron wurden von uns besonders eingehend studiert und werfen einige interessante Probleme auf, die im folgenden diskutiert werden sollen.

1. Biochemische und morphologische Charakterisierung der Hoden Testosteron-immunisierter Tiere

Nachdem wir beobachtet haben, dass in Testosteron-immunisierten Tieren die Anzahl der Leydig-Zellen und das Kernvolumen zunimmt, sollte die Frage geklärt werden, ob sich auch qualitative Unterschiede zum normalen Tier ergeben. Deshalb wurde zunächst die Konzentration von Testosteron in den Testes bestimmt. Bei normalen Tieren lag die testikuläre Testosteronkonzentration mit 180 ± 95 ng / g Testes in demselben Bereich, der für Rinder (LINDNER 1961), Ratten (RESKO et al. 1968), Ziegen (LEIDL et al. 1970), Schweine (ELSÄSSER et al. 1972) und Menschen (MORSE et al. 1973) mitgeteilt wurde. Die Konzentration in den Testes Testosteron-immunisierter Tiere liegt bei 475 ± 190 ng / g Testes und hat damit in demselben Masse zugenommen, wie der prozentuale Anteil der Leydig-Zellen am Hodengewebe. In derselben Grössenordnung hat auch die Stimulierbarkeit der Testes durch HCG *in vitro* zugenommen. Aus diesen Beobachtungen kann der Schluss gezogen werden, dass die quantitative Vermehrung der Leydig-Zellen keine qualitativen Änderungen der einzelnen Zelle nach sich zieht.

Vergleicht man die Testosteron-Produktion unter der HCG-Stimulation *in vitro* mit der Testosteron-Konzentration der Testes, so fällt auf, dass sowohl bei den normalen wie bei den immunisierten Tieren die Testosteron-Produktion nach 6 Std. etwa 30 - 40fach höher liegt als die ursprüngliche Testosteron-Konzentration in den Hoden. Diese Befunde demonstrieren, dass die Testes keine Speicherfunktion für Androgene haben, sondern dass der aktuelle Testosteronbedarf durch *de novo*-Synthese gedeckt wird. Ferner ist der selbst bis zur 6. Stunde lineare Anstieg der Testosteron-Produktion

unter HCG-Stimulation *in vitro* bemerkenswert, der auf ein überraschend hohes Reservoir an Prükursoren schliessen lässt. Allerdings ist eine relative Integrität des testikulären Gewebes Voraussetzung für diese hohe Syntheseleistung des Gewebes in den Inkubationsversuchen. Denn weder mit isolierten Leydig-Zellen noch mit Gewebsschnitten liess sich eine nur annähernd so hohe Testosteron-Produktion erreichen, wie mit möglichst unversehrten, jedoch dekapsulierten Testes von Ratten (DUFAU et al. 1972) oder Mäusen (VAN DAMME et al. 1973). Analog zu unseren *in vitro* Versuchen über die Stimulierbarkeit der Steroidsynthese in den Hoden durch HCG können die Befunde von GLESS et al. (1974) betrachtet werden, die *in vivo* im Cortisol-immunisierten Tier einen stärkeren Anstieg der Corticosteroide nach ACTH beobachteten als im normalen Tier.

Da Testosteron für die Spermiogenese notwendig ist (STEINBERGER 1971), die biologische Aktivität von Testosteron durch die Immunisierung jedoch neutralisiert wird, überrascht die histologische Betrachtung der Testes. Denn die Tubuli der immunisierten Tiere unterscheiden sich nicht von denen der normalen und es findet sich keine negative Beeinflussung der Spermiogenese. Dies ist ein Hinweis dafür, dass das in den Leydig-Zellen gebildete Testosteron direkt und bevor es in die Blutbahn gelangt, seine Wirkung auf die Tubuli entfaltet. Denn wenn es auf dem Blutwege an die Tubuli gelangte, würde es in den immunisierten Tieren durch die zirkulierenden Antikörper neutralisiert und eine Beeinflussung der Spermiogenese müsste die Folge sein. Diese Befunde könnten aber auch dahingehend interpretiert werden, dass die Spermiogenese unabhängig vom in den Leydig-Zellen produzierten Testosteron abläuft und die Tubuli selbst das notwendige Testosteron produzieren. Es sei daran erinnert, dass die Sertoli-Zellen als möglicher Ort der

Testosteron-Synthese diskutiert werden (LACY & PETTITT 1970).

2. Metabolismus von Testosteron im immunisierten Tier

Durch die Untersuchung der Halbwertszeit von Testosteron im Blut haben wir versucht, Aufschlüsse über den peripheren Metabolismus von Testosteron im immunisierten Tier zu erhalten. Testosteron-Halbwertszeiten normaler Kaninchen sind uns aus der Literatur nicht bekannt. Jedoch liegen die von uns gefundenen Werte in dem Bereich, in dem die Halbwertszeiten für Testosteron bei Mäusen (COYOTUPA et al. 1973) und Ratten (RESKO 1970) zu liegen scheinen, wenn man die von diesen Autoren angegebenen Daten entsprechend extrapoliert. Die Halbwertszeiten in den Testosteron-immunisierten Tieren ist im Mittel um das 2,5fache höher als in normalen Kaninchen.

Dieser Befund lässt den Schluss zu, dass nicht nur die Testosteron-Konzentration im peripheren Blut erhöht ist, sondern dass auch der Metabolismus durch die Bindung an den Antikörper verzögert wird. Dieser Schluss steht im Einklang mit den Befunden von VERMEULEN (1973), der im Menschen zeigen konnte, dass zwischen der Bindung von Testosteron im Plasma und der Metabolic Clearance Rate direkte Korrelation besteht. Mit unseren Befunden stehen auch die von SUNDARAM et al. (1973) und GLESS et al. (1974) im Einklang, die eine verzögerte Elimination von injiziertem radioaktiven Steroiden vom Plasma immunisierter Tiere fanden und damit ebenfalls Hinweise auf einen verzögerten Metabolismus erhielten.

3. Einfluss der aktiven Immunisierung mit Testosteron auf die akzessorischen Geschlechtsdrüsen

Der Einfluss des Testosterons auf den Nukleinsäurenstoffwechsel, die Eiweissynthese, die Funktion und die Morphologie der akzessorischen Geschlechtsdrüsen ist wohl dokumentiert. Dementsprechend ist die Atrophie dieser Drüsen nach aktiver Immunisierung mit Testosteron als Folge der neutralisierenden Wirkung der Antikörper zu betrachten.

Da die Rolle des zyklischen AMP in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen noch Gegenstand anhaltender Diskussion ist, werden mit der Bestimmung dieser Substanz in den Prostaten interessante Probleme angeschnitten. Denn obwohl die Funktion des zyklischen AMP als "second messenger" für die Wirkung der Proteohormone und der Catecholamine (KREBS 1973) aufgeklärt ist, ist die Frage noch nicht entschieden, ob das zyklische AMP auch eine vermittelnde Rolle in der Wirkung der Steroide spielt. Einerseits konnte gezeigt werden, dass zyklisches AMP einen "andromimetischen" Effekt auf die Samenblasen von kastrierten Ratten hat (SINGHAL et al. 1970) und dass die Konzentration zyklischen AMPs in der Prostata nach Kastration abfällt und nach Testosteron-Injektion wieder ansteigt (OFNER 1971). Andererseits aber war es nicht möglich, in hypophysektomierten (ROSENFELD & O'MALLEY 1970) oder intakten (LIAO et al. 1971) Ratten die Adenylzyklase-Aktivität in den Prostaten durch Testosteron zu stimulieren.

Die Situation wird noch weiter dadurch kompliziert, dass hypophysäre Hormone einen direkten Einfluss auf die akzessorischen Geschlechtsdrüsen nehmen sollen. So konnten GRAYHACK & LEBOVITZ (1967) zeigen, dass Prolaktin in Kombination mit Testosteron in hypophysektomierten und orchiekto-

mierten Ratten das Wachstum der Prostata anregten. GOLDER et al. (1972) fanden ferner, dass die Bildung von zyklischem AMP in Prostata-Homogenisaten durch LH alleine und durch Prolactin in Kombination mit Testosteron stimuliert wird.

Unsere Beobachtung einer verminderten Konzentration von zyklischem AMP in den Prostaten nach immunologischer Elimination von Testosteron könnte zur Unterstützung der Befunde herangezogen werden, die zeigen, dass zyklisches AMP durch Testosteron beeinflusst wird und dass es eine Mittlerfunktion für die Androgenwirkung auf molekularer Ebene hat. Unsere in vivo Befunde stehen jedoch nicht im Einklang mit den in vitro Befunden von GOLDER et al. (1972), da die erhöhte LH-Konzentration in den immunisierten Tieren nicht von einer erhöhten Konzentration an zyklischem AMP in den Prostaten begleitet wird.

IV. Abgrenzung der Immunisierung gegen Hormone gegenüber verwandten Phänomenen

Wenn man die eigentliche Funktion des Immunsystems darin sieht, den Organismus gegen innere und äussere Aggressoren zu schützen, dann bieten die hier vorgestellten Untersuchungen ein interessantes Beispiel dafür, wie dieses System pervertiert werden kann, um den Organismus, den es eigentlich schützen soll, zu invalidisieren. In einem gewissen Sinne könnte man von einer Art "Autoimmunisierung" oder "Autoimmunaggression" sprechen. Dabei darf man aber nicht vergessen, dass die hier beschriebene immunologische Neutralisation von Hormonen nichts mit anderen Phänomenen auf dem Grenzgebiet zwischen Endokrinologie und

Immunologie zu tun hat, für die bereits der Begriff "Autoimmunität" reserviert ist (Übersicht bei FEDERLIN 1969). Beispielhaft sei die Hashimoto-Thyreoiditis als Krankheitsbild aus diesem Formenkreis erwähnt. Denn bei diesen Erkrankungen handelt es sich um eine Autoimmunität gegen das Drüsengewebe selbst und nicht gegen das sezernierte Hormon, die zur Entzündung und Zerstörung der befallenen Drüse führt. Dass derartige entzündliche Erscheinungen bei unseren Versuchen nicht auftreten, geht auch aus der Tatsache hervor, dass in keinem der untersuchten Organe lymphozytäre Invasionen oder entzündliche Zeichen gefunden wurden.

Die Immunisierung gegen Hormone muss auch von den Erscheinungen abgegrenzt werden, die bereits in den 40er Jahren von ZONDEK & BROMBERG (1945, 1947) mit dem Begriff "endokrine Allergie" belegt wurden. Hiermit waren allergische Hautreaktionen gemeint, die bei Frauen nach der Behandlung mit Steroidhormonen oder während Phasen erhöhter endogener Steroidkonzentrationen (z.B. Progesteron in der Lutealphase) beobachtet werden. Obwohl ZONDEK & BROMBERG (1945, 1947) Antikörper gegen Steroide für diese Erscheinung verantwortlich machten und immer wieder Einzelfälle beschrieben wurden (SHELLEY et al. 1964; HOISCHEN & STEIGLEDER 1966; FARAH & SHBAKLU 1971), ist es bis heute nicht gelungen, Antikörper gegen Steroide in diesen Fällen mit Sicherheit nachzuweisen. Es erscheint äusserst unwahrscheinlich, dass tatsächlich Antikörper gegen Steroide in diesen Patienten spontan gebildet werden, da Steroide ungekoppelt nicht als Antigene wirksam werden können. Aber auch das spontane Auftreten von Antikörper gegen Proteohormone, die an sich Antigencharakter haben, scheint äusserst selten

zu sein und wurde bis in die letzten Jahre bezweifelt (z.B.HUMPHREY & WHITE 1965). In jüngster Zeit sind jedoch Fälle mit spontaner Antikörperbildung gegen Insulin beschrieben worden (FØLLING & NORMAN 1972; HIRATA et al. 1973).

V. Potentielle Anwendungen der Immunisierung gegen Hormone

Nach den Ausführungen im vorhergehenden Abschnitt werden also nur ganz vereinzelt Krankheitsbilder durch die spontane Immunisierung gegen Proteohormone erklärbar sein und es erscheint äusserst unwahrscheinlich, dass Antikörper gegen Steroide als Erklärung für bestimmte spontane (d.h. nicht-iatrogene) Krankheitsbilder von Bedeutung sind. Es erhebt sich jedoch die Frage, ob die Immunisierung gegen Hormone nicht als therapeutisches Prinzip angewandt werden könnte. Gerade der von uns untersuchte Einfluss der Immunisierung gegen Testosteron auf die Prostata, legt den Gedanken nahe, Antikörper gegen Steroide in der Behandlung hormonabhängiger Tumoren einzusetzen, wie z.B. Prostata- oder Mammacarcinom. Es ist erstaunlich, dass von dieser Möglichkeit in der experimentellen Tumorforschung bisher nur sehr begrenzter Gebrauch gemacht wurde. Erste singuläre Versuche waren jedenfalls sehr erfolgversprechend (CALDWELL et al. 1971). In ähnlicher Weise könnten krisenhafte Überfunktionszustände endokriner Drüsen, die einer Intoxikation gleich kommen, wie z.B. die thyreotoxische Krise, bei der der Organismus mit Schilddrüsenhormonen überschwemmt wird, durch ein entsprechendes Antiserum behandelt werden. Dieser Gedanke lässt sich auch auf exogene - nicht nur durch Hormone verursachte - Intoxikationen übertragen, die durch spezifische Antiseren behandelt werden könnten. In dieser Hinsicht sind erste Untersuchungen

an Digoxin behandelten Versuchstieren aufschlussreich (SCHMIDT & BUTLER 1971; WATSON & BUTLER 1972), die zeigten, dass beispielsweise auch Substanzen wie Digoxin durch Antikörper neutralisiert werden können. Darüberhinaus erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass die pathologischen Auswirkungen autonomer Adenome endokriner Organe durch Antikörper beeinflusst werden können, da die Kapazität der Antikörper über längere Zeit nicht ausreichen wird, alles gebildete Hormon abzufangen und in seiner biologischen Aktivität zu neutralisieren. Der einzige uns bisher bekannte Versuch in dieser Richtung, nämlich der Versuch, die Akromegalie durch aktive Immunisierung gegen Wachstumshormon zu behandeln (FRANTZ & RABEN 1967) blieb wahrscheinlich aus diesem Grunde erfolglos. Erste Experimente, durch aktive Immunisierung gegen HCG, das mit LH kreuzreagiert, die Ovulation in Frauen zu unterdrücken, wurden von STEVENS & CRYSTLE (1973) vorgelegt. Hier eröffnet sich eine neue Möglichkeit zur Fertilitätskontrolle im Menschen.

Diese Ausführungen zeigen, dass es gegenwärtig in der praktischen Medizin noch keine Anwendung der Neutralisation von Hormonen gibt, dass sich jedoch zahlreiche Möglichkeiten eröffnen. Diese Möglichkeiten zu erschliessen und im Versuchstier zu erproben, ist Gegenstand der experimentellen Forschung, in der das Studium der biologischen Effekte der Immunisierung gegen Hormone einen festen Platz hat. In diesem Sinne hofft die vorgelegte Arbeit, einen Beitrag geleistet zu haben.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl zur Gewinnung von Antiseren für die radioimmunologische Bestimmung von Steroiden eine immer grössere Anzahl von Versuchstieren gegen Steroide immunisiert wird, wurden die möglichen Auswirkungen der Immunisierung auf den tierischen Organismus bisher weitgehend vernachlässigt. Durch diese Situation angeregt, wurde in der vorliegenden Arbeit den biologischen Effekten der aktiven Immunisierung mit Steroiden nachgegangen. Dazu wurden verschiedene biologische, biochemische und morphologische Aspekte der Immunisierung mit Testosteron und Oestrogenen und der Einfluss der aktiven Immunisierung mit Androgenen, Oestrogenen und Corticosteroiden auf die hypothalamo-hypophysär-gonadalen und -adrenalen Regelkreise im Kaninchen untersucht.

Dazu wurden im Serum normaler und immunisierter Tiere zahlreiche Steroide sowie LH und FSH radioimmunologisch und die prozentuale Bindung von Steroiden mittels Äquilibriumdialyse bestimmt. Die Antiseren wurden durch Bestimmung von Titer und Spezifität charakterisiert. Testes und Nebennierenrinden wurden morphologisch durch Histometrie und Messung des Kernvolumens der endokrin-aktiven Zellen evaluiert. Die endokrine Kapazität der Testes wurde durch den Testosterongehalt und die Produktion von Testosteron unter HCG-Stimulation *in vitro* bestimmt. Die Halbwertszeit von Testosteron wurde über den Abfall der Konzentration im Serum nach Kastration gemessen. Die akzessorischen Geschlechtsdrüsen wurden histologisch und biochemisch (Konzentration den zyklischen AMPs) untersucht.

Zur Immunisierung der Kaninchen bewährte sich ein

von uns entwickeltes Verfahren, das auf einmaligen intradermalen Injektionen an zahlreichen Körperstellen basiert. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass nur µg-Konzentrationen des Immunogens benötigt werden und ohne Booster-Injektionen bereits nach 3 Wochen Antikörper messbar sind.

Die Befunde bei den Testosteron-immunisierten männlichen Kaninchen lassen sich als "immunologische Kastration" zusammenfassen: Es wird ein Verlust der sexuellen Aktivität, eine Atrophie der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, eine Verlangsamung des Testosteron-Metabolismus und eine Erhöhung der Gonadotropine beobachtet. Paradoxerweise zeigen die Testes dieser Tiere eine Hyperplasie der Leydig-Zellen und der Tubuli und im Serum findet sich eine bis 100fache Erhöhung der Testosteron-Konzentration bei gleichzeitigem Anstieg der Bindung des Testosterons von 90 % auf nahezu 100%, was einem Abfall des freien, biologisch aktiven Anteils entspricht. Als gemeinsame Ursache der beobachteten Veränderungen kann somit eine Neutralisation des Testosterons durch Bindung an den Antikörper angenommen werden.

Wie die weiteren Untersuchungen zeigen, kann die immunologische Neutralisation eines Steroids zum Studium endokriner Regelkreise angewandt werden. Dabei kann der regulatorische Einfluss eines bestimmten Steroids im Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Testes bzw. Nebennierenrinden als erwiesen gelten, wenn die durch Bindung an den Antikörper herbeigeführte Verminderung des freien, biologisch aktiven Anteils des in der Blutbahn zirkulierenden Steroids einen Feedback-Effekt auslöst,

der zu vermehrter Sekretion der glandotropen Hormone und damit zu Hyperfunktion und Hypertrophie der peripheren Drüse führt. In entsprechenden Versuchen wird der Einfluss des Testosterons auf die Sekretion von LH und FSH bestätigt. Oestradiol dagegen wirkt nur auf die LH-, nicht aber auf die FSH-Sekretion. Im Feedback-Kontrollsystem der Nebennierenrinde erscheinen neben Cortisol und Corticosteron Aldosteron und Dehydroepiandrosteron von regulatorischem Einfluss zu sein. Die Aussagekraft der immunologischen Methode zum Studium endokriner Regelkreise wird allerdings durch die Spezifität der gebildeten Antikörper limitiert, wie die Ergebnisse nach Immunisierung mit Androstendion, 5α- und 5β-Dihydrotestosteron zeigen.

Neben diesen spezifischen, durch die Bindung an den Antikörper im Serum bewirkten Effekten konnten keine deletären Nebenwirkungen an den endokrinen Drüsen oder an anderen Organen beobachtet werden, wie sie von autoimmunologischen Reaktionen im endokrinen System her bekannt sind (z.B. lymphozytäre Invasion oder Zerstörung der Drüse). Dies erscheint vor allem im Hinblick auf die mögliche Anwendung der immunologischen Neutralisation von Steroiden in der Therapie - z.B. zur Behandlung von hormon-abhängigen Tumoren - erwähnenswert.

Abb. 1 Herstellung eines Steroidkonjugates. Beispiel: Dehydroepiandrosteron, das nach Oximbildung durch eine gemischte Anhydridreaktion an Albumin gekoppelt wird.

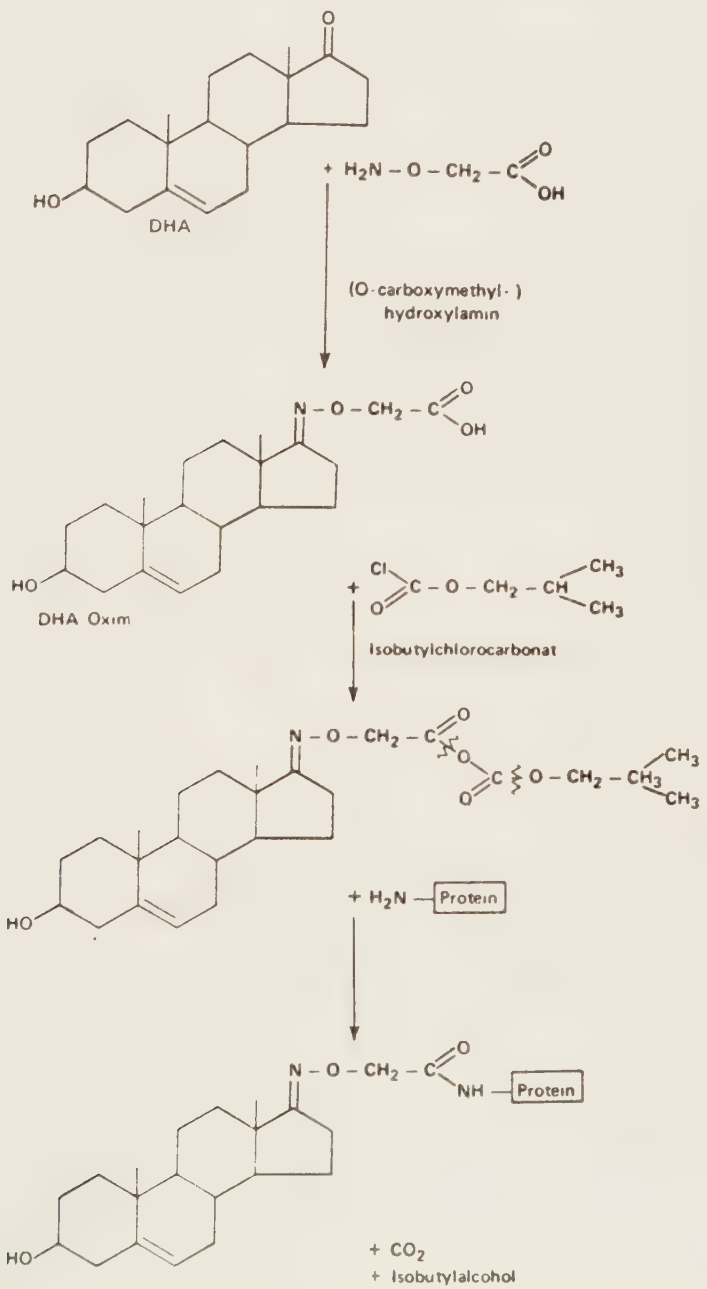
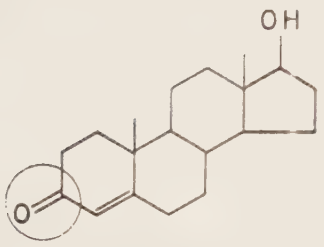
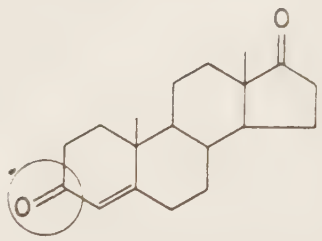


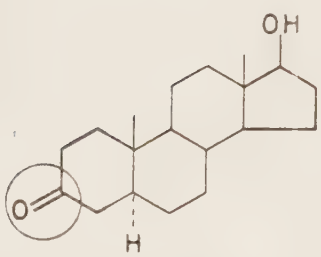
Abb. 2 Strukturformeln der zur Immunisierung benutzten Steroide. Die Kreise indizieren die Positionen am Molekül, über die das Steroid an Protein gekoppelt wurde.



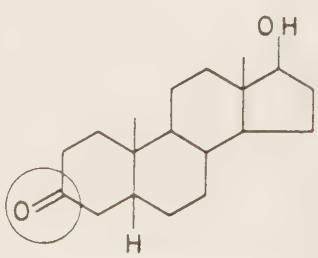
Testosteron



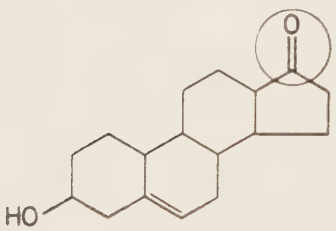
Δ⁴ - Androstenedion



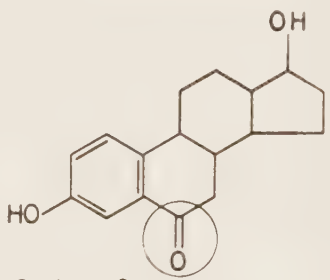
5α - Dihydrotestosteron



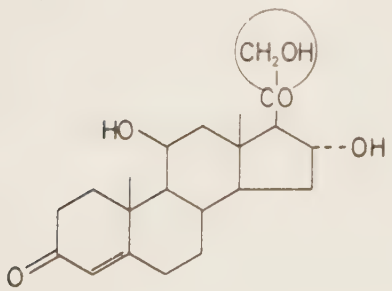
5β - Dihydrotestosteron



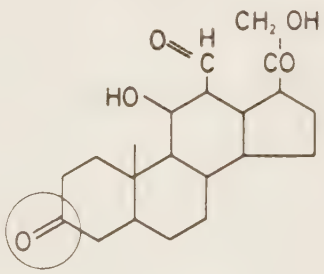
Dehydroepiandrosteron



6-Keto-Oestradiol



Cortisol



Aldosteron

Abb. 3 Ermittlung des Titers eines Antiserums mit Hilfe einer Verdünnungskurve.

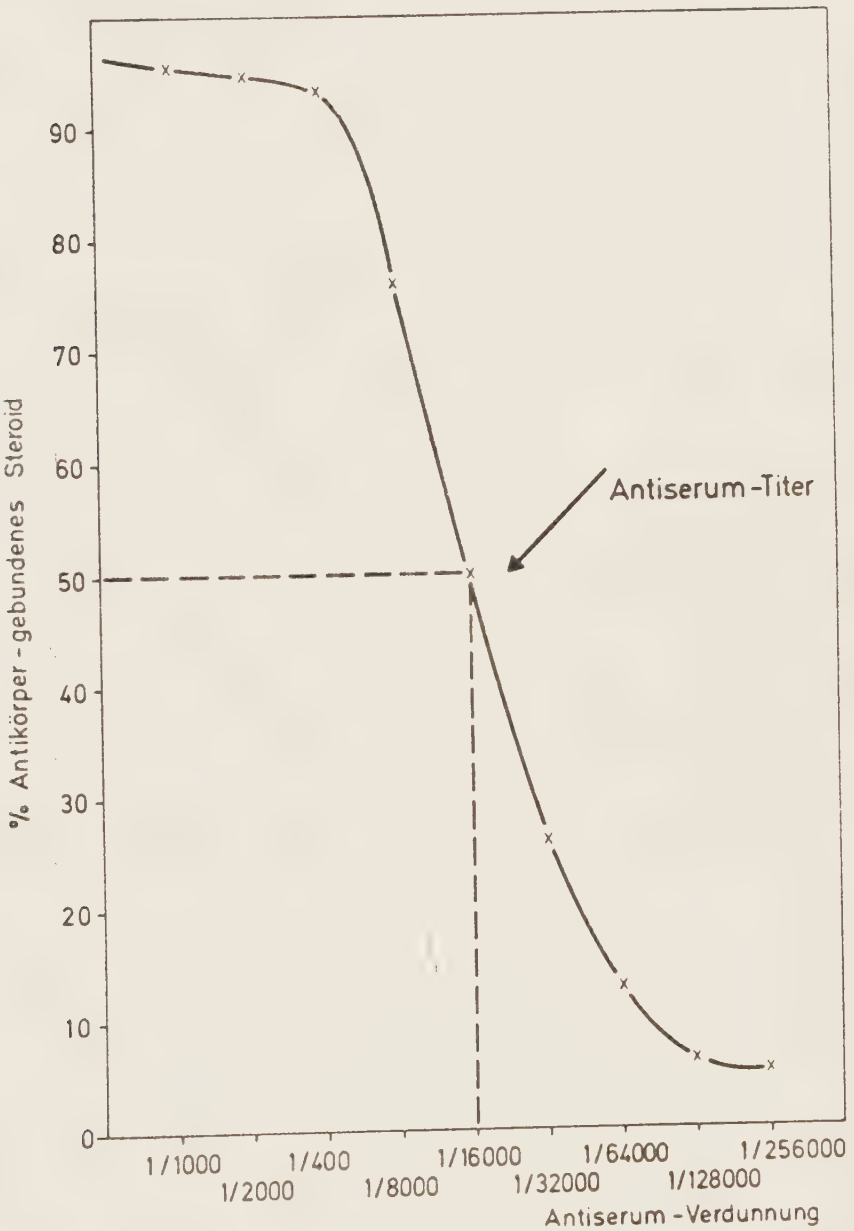


Abb. 4 Ermittlung der Spezifität des Antiserums gegen Testosteron-3-BSA.

Abb. 5 Schematische Darstellung des simultanen Radioimmunoassays für Testosteron (T) und Androstendion (A).

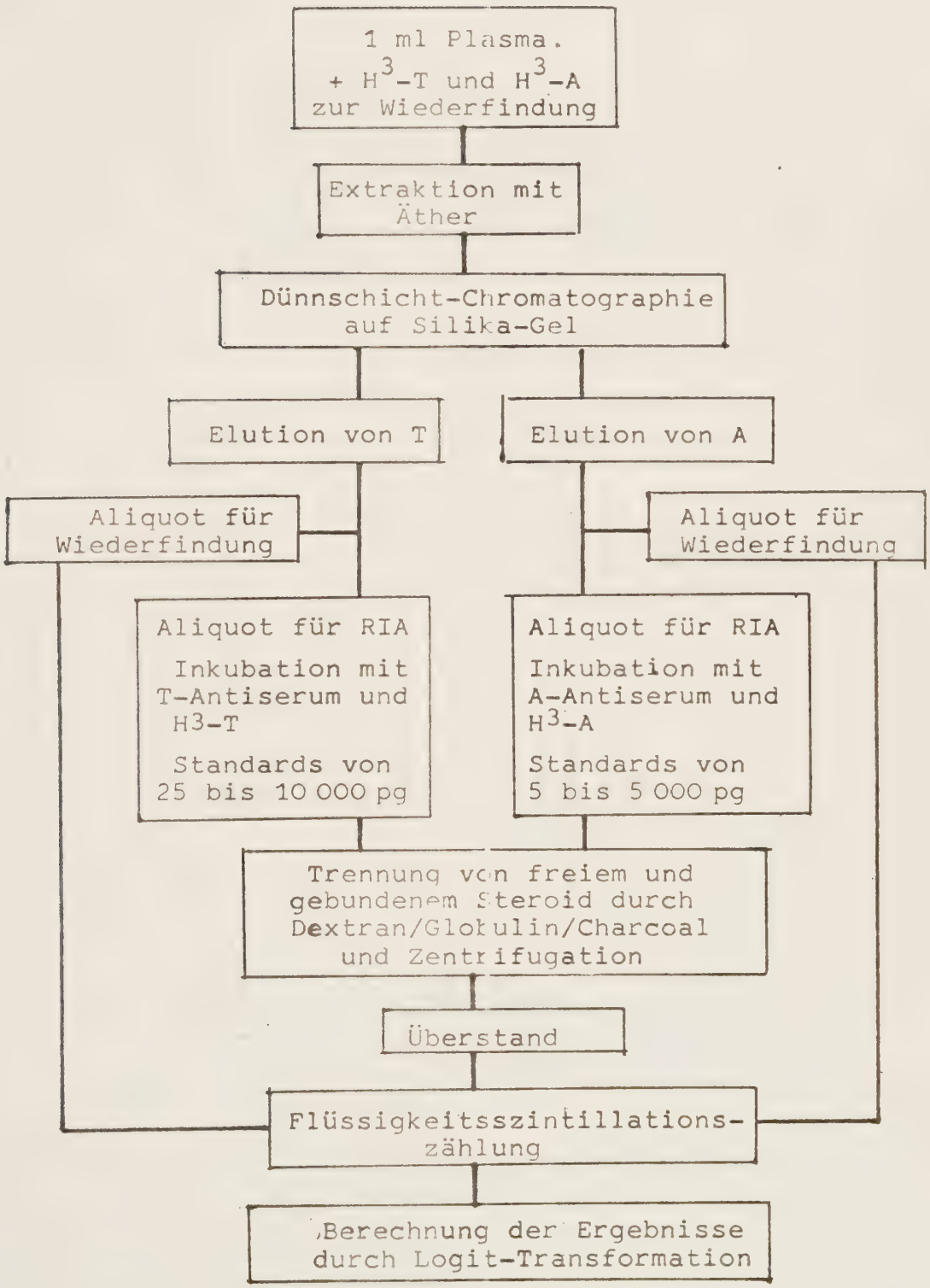


Abb. 6 Höchste Antiserum-Titer, die bei 128 Kaninchen nach der einmaligen, intradermalen Immunisierung gegen verschiedene Steroid-Konjugate gemessen wurde.

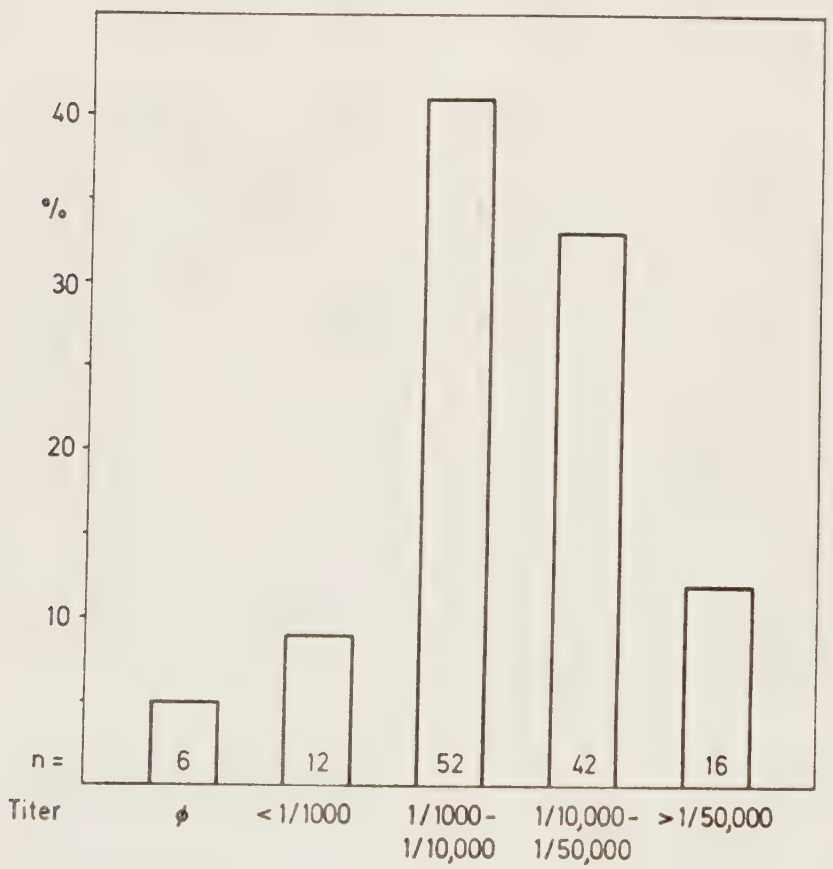


Abb. 7 Verlauf der Antiserum-Titer von 8 männlichen, gegen Testosteron immunisierten Kaninchen.

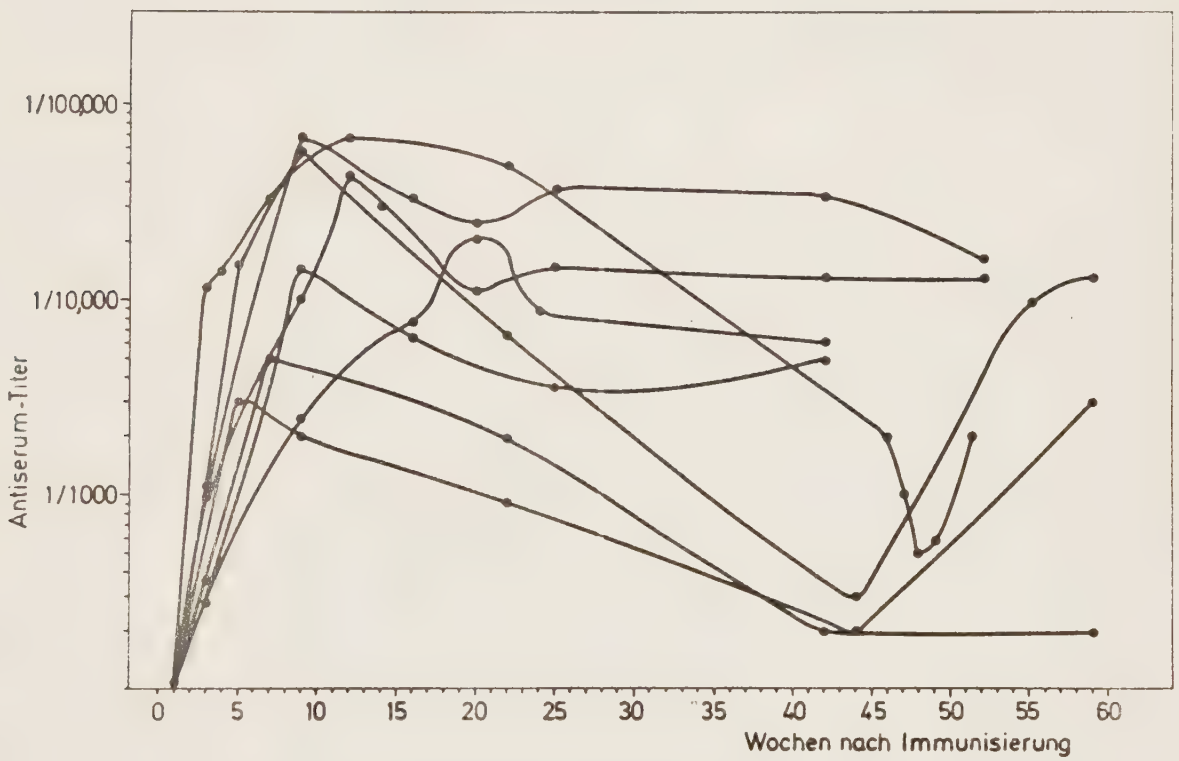


Abb. 8 Gewichtszunahme von 10 Testosteron-immunisierten (offene Kreise) und 5 normalen (geschlossene Kreise) männlichen Kaninchen.

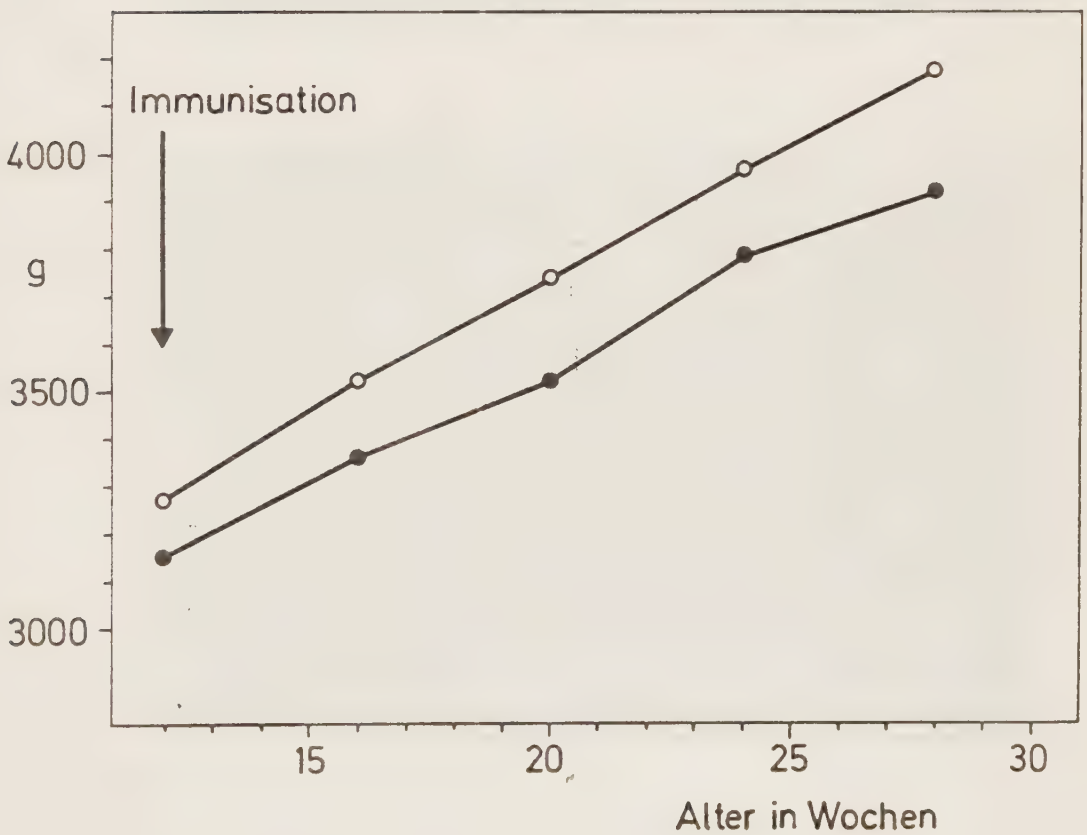


Abb. 9 Oberes Bild: Histologisches Bild der Samenblase eines normalen Kaninchens (HE-Färbung, Vergr. 250x)

Unteres Bild: Histologisches Bild der Samenblase eines gegen Testosteron immunisierten Kaninchens (HE-Färbung, Vergr. 250x).

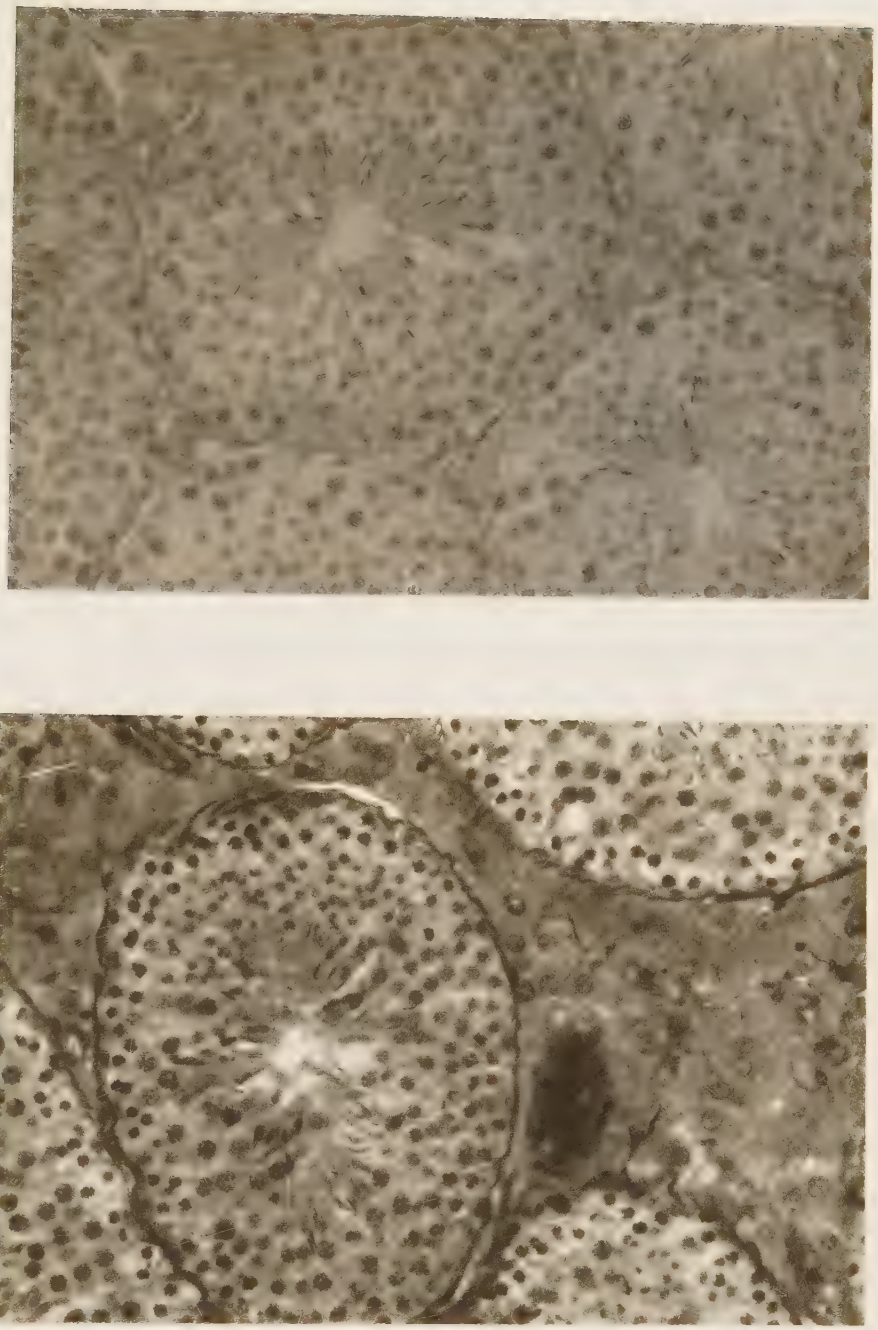


Abb 10 Oberes Bild: Histologisches Bild des Hodens eines normalen Kaninchens (HOPA-Färbung, Vergr. 400 x)

Unteres Bild: Histologisches Bild des Hodens eines gegen Testosteron immunisierten Kaninchens mit deutlich erkennbarer Leydig-Zell-Hyperplasie (HOPA-Färbung, Vergr. 400 x).

Abb. 11 Testosteron-Konzentration in den Testes normaler (weiße Säulen) und Testosteron-immunisierter (schwarze Säulen) geschlechlechtsreifer Kaninchen.

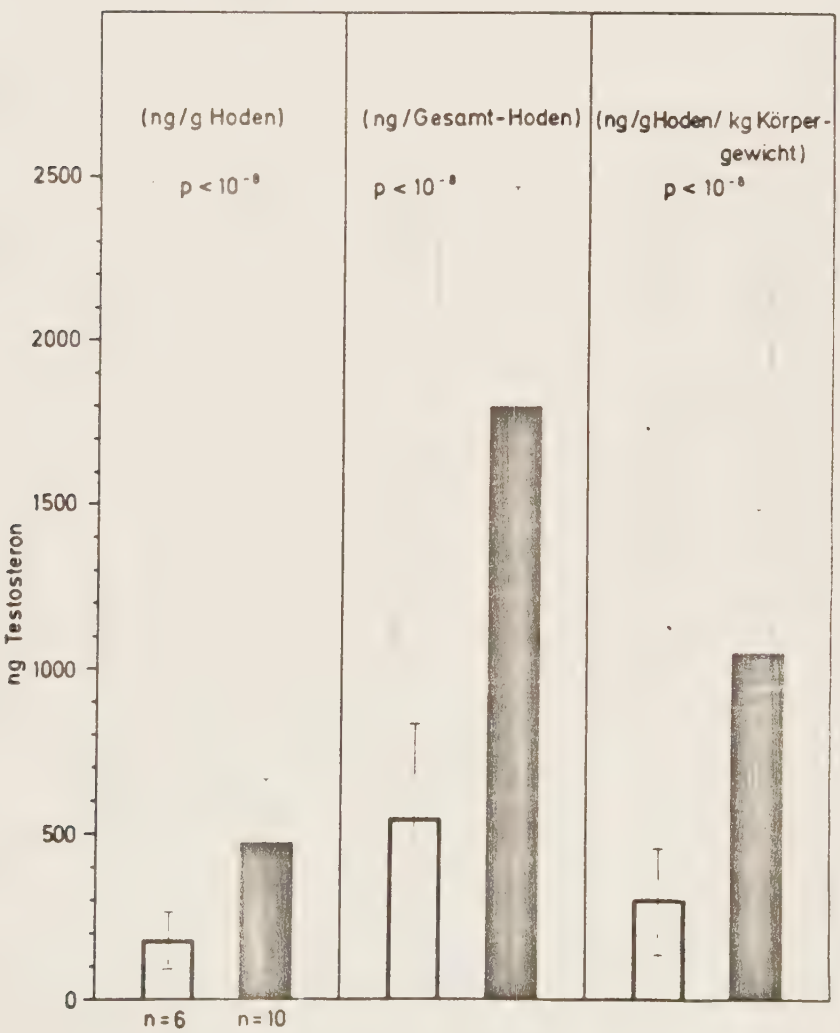


Abb. 12 In vitro - Stimulation der testikulären Testosteron-Produktion durch HCG bei normalen (geschlossene Kreise) und bei Testosteron-immunisierten (offene Kreise) Kaninchen. Die unterbrochene Linie zeigt die Testosteron-Produktion ohne Zusatz von HCG.

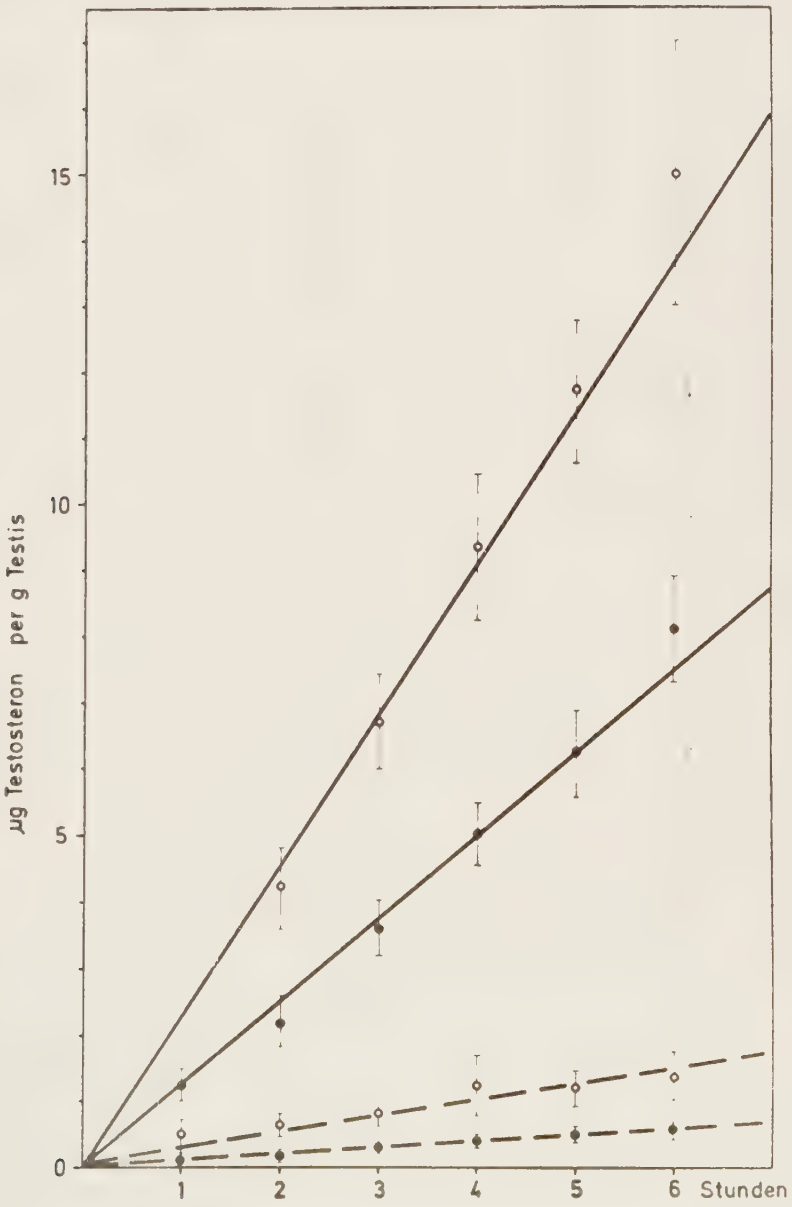


Abb. 13 Der Abfall der Testosteron-Konzentration im peripheren Plasma nach Kastration von normalen (geschlossene Kreise) und von Testosteron-immunisierten (offene Kreise) Kaninchen.

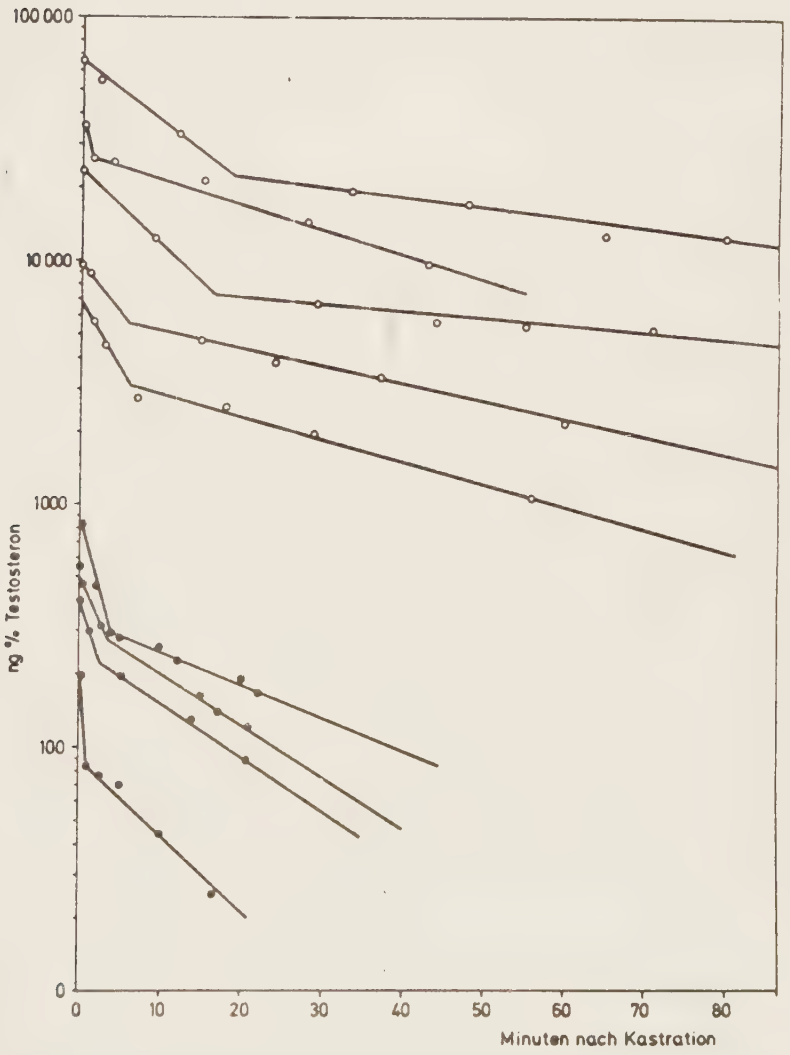


Abb. 14 Prozentanteil der Leydig-Zellen am Hodengewebe (Ordinate) normaler Kaninchen und solcher, die mit Cortisol (F), Aldosteron (Aldo), Dehydroepiandrosteron (DHA), Androstendion(Δ^4-A), Testosteron (T), 5α-Dihydrotestosteron (5α-DHT), 5ß-Dihydrotestosteron (5ß-DHT) und Oestradiol (E_2) immunisiert wurden. Die Nummern am unteren Rand beziehen sich jeweils auf ein Tier.

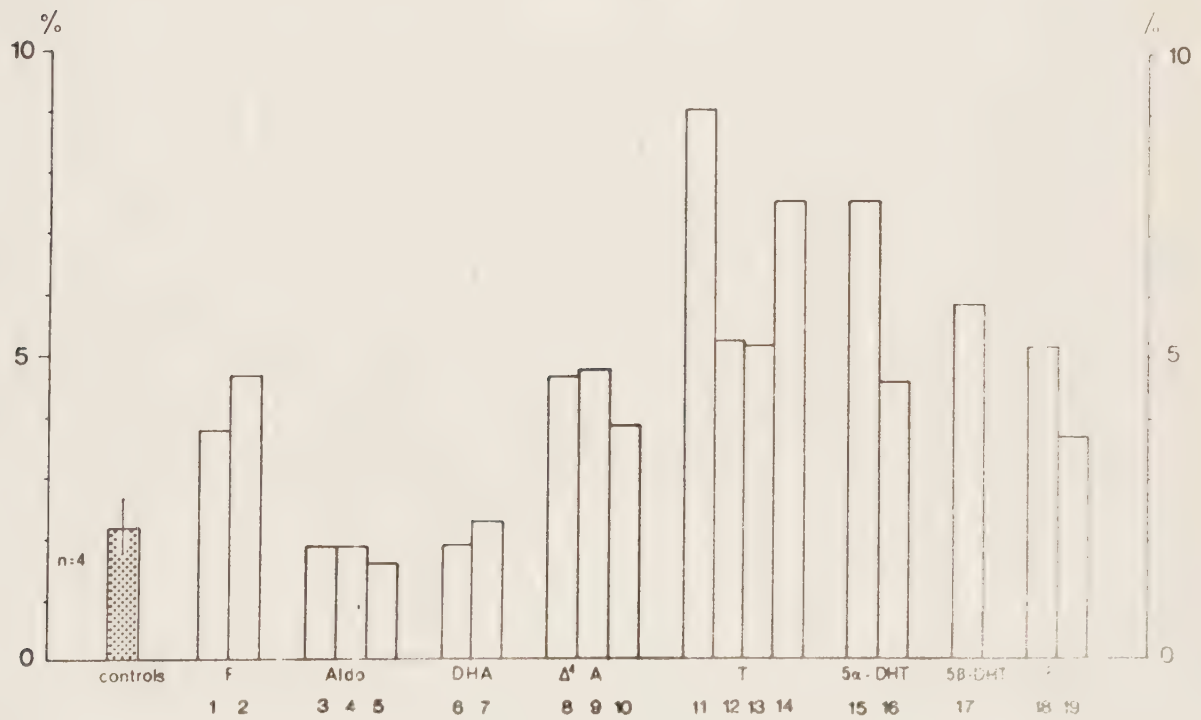


Abb. 15 Kernvolumen (Ordinate) der Leydig-Zellen normaler und mit verschiedenen Steroiden immunisierter Kaninchen. Abkürzungen wie in Abb. 14.

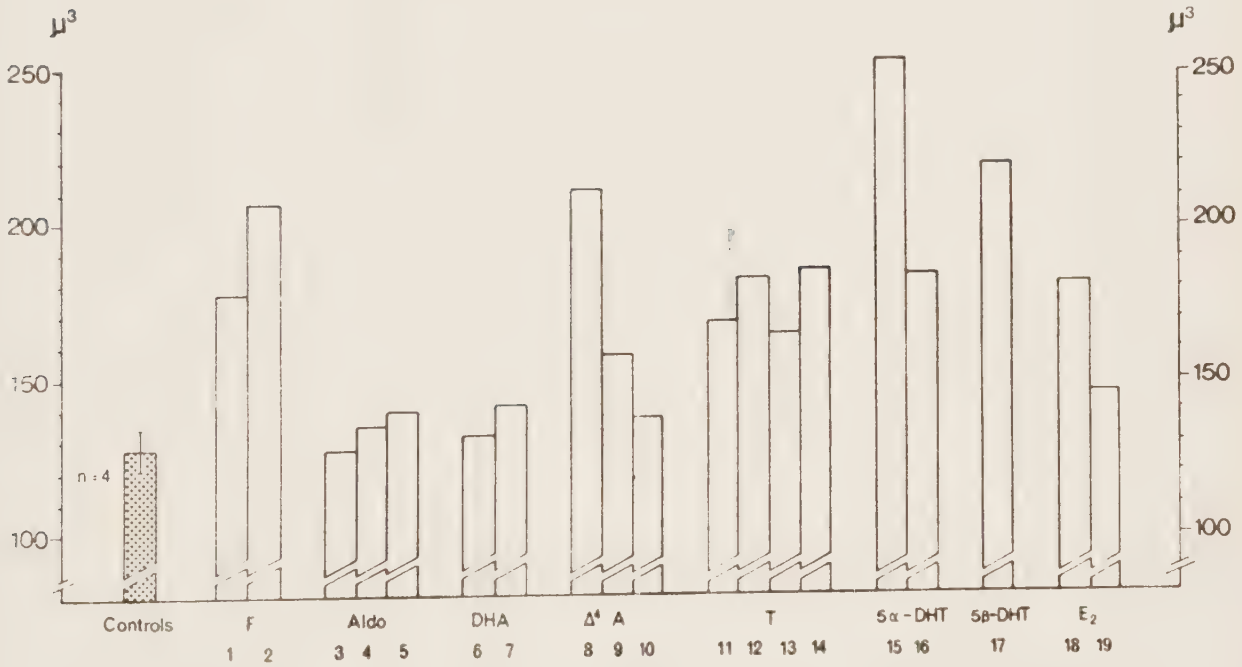


Abb. 16 Hodengewichte (Ordinate) normaler und mit verschiedenen Steroiden immunisierter Kaninchen. Jede Säule repräsentiert das Gewicht des rechten Hodens des betreffenden Tieres. Abkürzungen wie in Abb. 14.

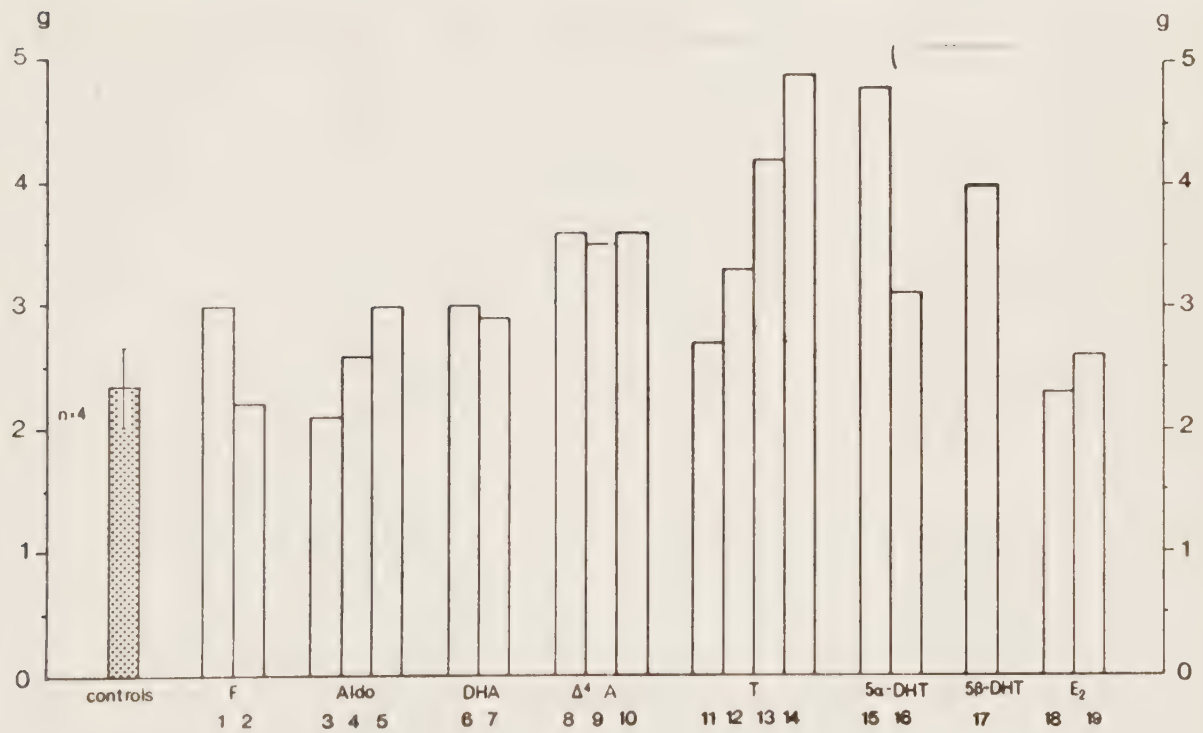


Abb. 17 Das Kernvolumen (Ordinate) der Nebennierenrinden-Zellen normaler und mit verschiedenen Steroiden immunisierter Kaninchen. Abkürzungen wie Abb. 14.

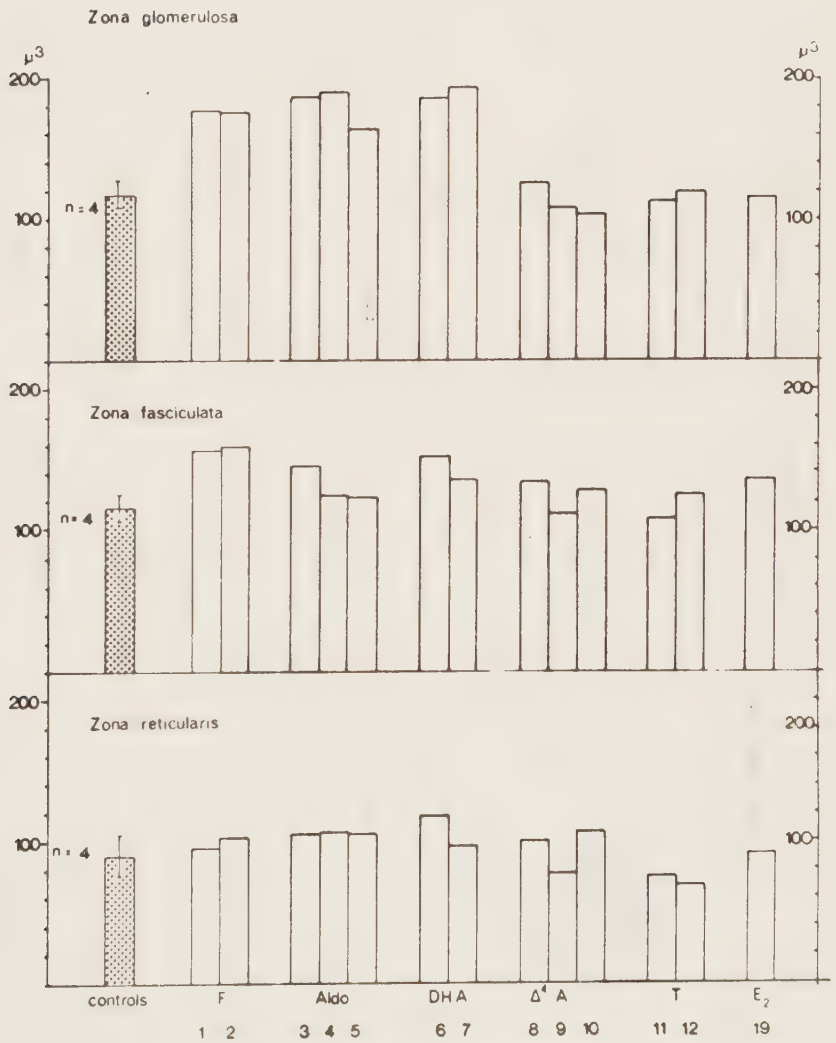


Abb. 18 Schematische Darstellung des Regelkreises zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Testes normaler (linke Bildhälfte) und Testosteron-immunisierter (rechte Bildhälfte) Kaninchen. (T = Testosteron; LH = luteinisierendes Hormon; LH-RH = LH Releasing Hormon; TeBG = Testosteron bindendes Globulin; TeAB = Testosteron - Antikörper).

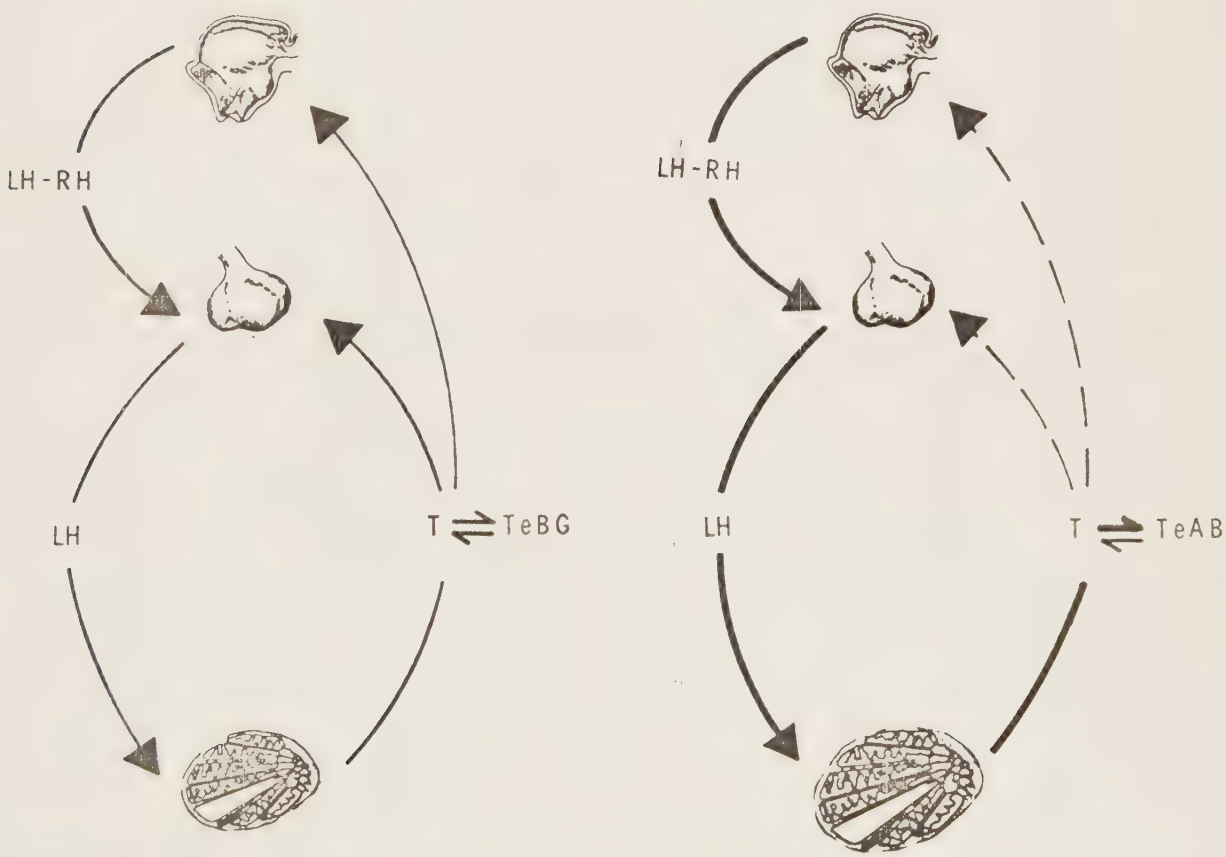


Tabelle 1

Verlässlichkeitskriterien des simultanen Radioimmunoassays für Testosteron (T) und Androstenedion (A)

	T	A
Präzision		
Intraassay- (VK %)	8	9
Interassay- (VK %)	11	12
Richtigkeit		
Wiederfdg. v. Wasser (%)	99 ± 4	99 ± 3
Wiederfdg. v. Plasma (%)	100 ± 6	100 ± 4
Wiederfdg. im Assay (%)	73 ± 7	76 ± 4
Sensibilität (pg/Röhrchen)	25	10
Praktikabilität		
Proben / MTA / Woche	40 - 50	40 - 50

Tabelle 2

Simultaner Radioimmunoassay für Testosteron (T) und Androstendion (A).

Kreuzreaktion verschiedener Steroide mit den Antiseren und R_f-Werte dieser Steroide im verwandten TLC - System.

	Kreuzreaktion (%) des Antiserums		R_f-Werte
	T-3-BSA	A-3-BSA	
Testosteron	100	2	0,45
Dihydrotestosteron	60	0,8	0,57
Epitestosteron	0,1	-	0.45
Androstendion	0,3	100	0,65
Androstendiol	1,6	0,006	0,36
Dehydroepiandrosteron	0,002	3,0	0,57
Pregnenolon	0,001	0.003	0,57
17-OH-Pregnenolon	0,001	0,001	0,36
Progesteron	0,05	0,05	0,7
17-OH-Progesteron	0,03	0,05	0,52
Deoxycorticosteron	0,001	0,001	-
Oestron	0,001	0,001	0,77
Oestradiol	0,003	0,001	0,56
Oestriol	0,001	0,001	0,09

Tabelle 3

Funktion der Testes normaler und Testosteron-immunisierter Kaninchen

	Testosteron im Serum (ng%)	Prozent. Bdg.	Antiserum-Titer
Normale Kaninchen (n = 5)	408 ± 172	90,4 ± 1,5	-
Imm. Kaninchen			
Nr. 1	31200	99,0	1/20000
2	29900	98,7	1/13000
3	17900	98,6	1/ 6000
4	8480	99,1	1/ 7000
5	13660	99,3	1/ 8000
6	8390	99,4	1/32000
7	9700	99,3	1/ 6400
8	10820	99,6	1/12000
9	8250	99,3	1/ 7000
10	11118	99,1	1/ 6000

Tabelle 4

Einfluss der aktiven Immunisierung mit Testosteron oder Oestrogenen auf die sexuelle Aktivität erwachsener männlicher Kaninchen

	Gewicht	Sexuelle Aktivität	Antiserum Titer	Testosteron im Serum (ng%)	Prozentuale Bindung von Testosteron	Oestradiol
Normale Kaninchen (n = 5)	3310 ± 240	+	-	408 ± 172	90,4 ± 1,5	81,6 ± 2,5
Testosteron-imm. Kaninchen						
Nr. 1	3100	-	1/ 8000	3662	99,3	89,1
2	3680	-	1/32000	8388	99,4	94,7
3	3050	-	1/ 6400	9706	99,3	91,4
4	3850	-	1/12000	10820	99,6	92,7
5	3420	-	1/ 7000	8254	99,3	-
6	3650	-	1/ 6000	11186	99,1	89,9
MW ± s.d.	3460 ± 330			8669 ± 2773	99,3 ± 0,2	91,6 ± 2,2
Oestrogen-imm. Kaninchen						
Nr. 1	3050	+	1/16000	293	98,7	98,9
2	3450	+	1/14000	342	94,4	98,7
3	4050	+	1/ 1200	144	89,5	98,8
4	3500	+	1/15000	559	91,7	98,7
5	3100	+	1/ 7000	770	88,2	98,9
6	3340	+	1/ 7000	595	93,9	98,9
7	3680	+	1/ 4000	405	89,7	99,0
MW ±	3450 ± 340			444 ± 211	91,6 ± 2,5	98,8 ± 0,1

Tabelle 5 Gewicht der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und Konzentration von zyklischem AMP in den Prostaten normaler, Testosteron- und Oestrogen-immunisierter Kaninchen. (Mittelwerte und s.d.)

	Trockengewicht (g)	zyklisches AMP (pMol / mg)
Normale Tiere (n = 8)	0,51 ± 0,09	8,03 ± 2.21
Testosteron-imm. Tiere (n = 12)	0,34 ± 0,11 §	5.40 ± 1,35 §
Oestrogen-imm. Tiere (n = 8)	0,42 ± 0,13	6,43 ± 1,83

§ Signifikanz des Unterschiedes: $p < 0,05$

Tab. 6

Morphologie der Testes normaler und Testosteron-immunisierter Kaninchen (MW ± sd)

	Normal (n = 4)	immunisiert (n = 8)	Unterschied $p \leq$
Gewicht des rechten Hodens (g)	2,11± 0,22	3,83± 0,68	0,001
Histometrie (% von 6000 Treffern)			
Leydig-Zellen	2,4 ± 0,2	6,7 ± 2,0	0,005
Gefässe	1,7 ± 0,5	2,8 ± 0,8	0,05
Restliches Interstitium	6,2 ± 1,8	5,1 ± 1,2	n.s.
Tubuli	72,8 ± 9,4	71,3 ± 7,8	n.s.
Dehiscensen	18,4 ± 7,1	12,6 ± 7,5	n.s.
Leydig-Zell-Kernvolumen (μ^3)	140 ± 14	191 ± 24	0,01

n.s. = nicht signifikant

Tabelle 7 Halbwertszeiten von Testosteron nach Kastration von normalen und von Testosteron-immunisierten männlichen Kaninchen

		Testosteron im Plasma vor Kastration	Halbwertszeit
Normale Tiere			
	1	480	15
	2	130	11
	3	352	19
	4	400	13
	5	400	16
	6	844	23
	7	190	13
	8	145	12
	9	559	21
	10	756	22
	11	115	11
	12	141	27
	MW	376	16,9
	se	± 72	± 1,5
Testosteron-immunisierte Tiere	1	8080	33
	2	9530	42
	3	11800	28
	4	18000	46
	5	23260	92
	6	18570	47
	7	35830	44
	8	19120	27
	9	68000	64
	10	24500	39
	MW	+ 23669	46,2
	se	- 5554	± 6,1
Signifikanz der Unterschiede		$p < 10^{-3}$	$p < 10^{-3}$

Tabelle 8

Konzentrationen von Steroiden und Gonadotropinen im Serum normaler und immunisierter männlicher Kaninchen

		TC (µg/100 ml)	DHA (ng/100 ml)	Δ^4-A (ng/100 ml)	T (ng/100 ml)	E_1 (pg /1 ml)	E_2 (pg /1 ml)	LH (ng/ 1 ml)	FSH (ng / 1 ml)
Kontrollen (n = 5)		1,9 (0,5 - 3,0)	276 180 - 396)	33 (17 - 57)	419 (214 - 674)	10 (8 - 12)	8 (4 - 12)	3,9 (3,1 - 4,5)	352 (70 - 650)
Imm. mit:									
F.	Nr. 1	10,0	394	520	1070	17	11	3,8	750
	2	14,2	355	606	921	13	10	-	-
Aldo	3	11,2	125	42	280	14	5	3,3	190
	4	20,4	194	253	342	-	-	-	-
	5	-	-	16	224	13	5,5	4,3	270
DHA	6	5,7	1368	66	261	7	3	4,7	690
	7	9,7	1296	77	429	7	3,5	3,8	250
Δ^4-A	8	10,2	2754	1429	5882	27	19	9,0	590
	9	-	846	4772	847	10	5	-	-
	10	5,0	528	898	816	10	4,5	3,1	220
T	11	1,2	229	178	31200	7	11	4,7	780
	12	3,0	267	32	29900	10	24	5,0	950
	13	4,9	456	29	17900	7	12	6,0	1800
	14	6,0	456	107	8480	7	12	5,0	520
5x-DHT	15	-	951	68	6162	24	35	19,0	1350
	16	1,5	404	92	2238	35	28	6,6	520
5ß-DHT	17	-	-	-	1347	29	20	9,4	560
E_2	18	0,5	274	-	1465	15	40	5,3	520
	19	1,2	321	-	1379	18	25	7,0	220

Tabelle 9

Prozentuale Bindung von Steroiden im Serum normaler und immunisierter Kaninchen

	Prozentuale Bindung von						
	F	B	Aldo	DHA	Δ^4-A	T	E_2
Kontrollen	88,7	73,7	27,0	84,1	64,5	90,3	80,6
Imm. mit:							
F	98,5	91,7	45,9	97,3	88,9	96,5	88,1
Aldo	91,4	77,4	95,3	91,2	-	94,3	90,4
DHA	86,5	73,5	39,9	98,7	94,2	96,1	88,6
Δ^4-A	89,0	81,0	51,4	88,6	99,6	98,4	87,9
T	85,5	-	28,1	88,7	92,6	98,8	82,7
5α-DHT	-	-	-	93,9	87,3	99,5	88,8
5β-DHT	-	-	-	-	-	99,5	89,3
E_2	87,2	-	52,1	90,8	-	93,5	98,1

Tabelle 10

Spezifität der Antiseren, ausgedrückt in Prozent der Kreuzreaktion

	Antiserum gegen							
	F	Aldo	DHA	Δ^4-A	T	5α-DHT	5β-DHT	E_2
F	100	0,003	0,001	1,5	0,001	0,001	0,001	0,001
E	35	0,01	0,001	-	0,001	0,001	0,001	0,001
B	48	0,014	0,0016	0,6	0,006	0,001	0,001	0,001
Aldo	0,001	100	0,001	-	0,001	0,001	0,001	0,001
DHA	0,03	0,001	100	3,4	0,002	1,3	2,0	0,001
Δ^4-A	0,08	0,01	0,46	100	0,3	0,5	1,4	0,001
T	7,5	0,001	0,6	2,1	100	100	100	0,001
5α-DHT	-	0,001	0,4	0,4	60	100	70	0,001
5β-DHT	-	0,001	-	-	8	10	70	-
E_1	-	0,001	-	-	0,09	0,1	0,17	0,5
E_2	0,001	0,001	0,001	0,001	0,06	0,1	0,001	100
E_3	-	0,001	-	-	0,05	0,05	0,001	1,0

Tabelle 11

Bindungs-Charakteristika zwischen Testosteron und Albumin, Transcortin, Testosteron-bindendem Globulin und Testosteron-Antikörper

	Bindungsaffinität (Liter / Mol)	Bindungskapazität (Mol / Liter)
Albumin	2×10^{4}	4×10^{-4}
Transcortin	5×10^{6}	$1,5 \times 10^{-7}$
Testosteron-bindendes Globulin	2×10^{8}	2×10^{-7}
Testosteron-Antikörper	4×10^{9}	$2,5 \times 10^{-6}$

(nach Nieschlag & Loriaux 1972)

G. Literatur

Abraham G.E.: A Solid-phase radioimmunoassay for estradiol-17ß.
J. clin. Endocr. Metab. 29 (1969) 866

Abraham G.E.: Radioimmunoassay of steroids in biological materials.
Acta endocr. suppl. 183 (1974)

Arimura A., Sato H., Kumasaka T., Worobec R.B., Debeljuk L., Dunn J. & Schally A.V.: Production of antiserum to LH-RH associated with gonadal atrophy in rabbits: development of radioimmunoassays for LH-RH.
Endocrinology 93 (1973) 1092

Armin J., Grant R.T. & Wright P.H.: Experimental diabetes in rats produced by parenteral administration of anti-insulin serum.
J. Physiol. 153 (1960) 146

Banting F.G., Frank W.R. & Gairus S.: Anti-insulin activity of serum of insulin treated patients.
Amer. J. Psychiat. 95 (1938) 562

Bidlingmaier F., Wagner-Barnack M., Butenandt G. & Knorr D.: Plasma estrogens in childhood and puberty in physiological and pathological conditions.
Ped. Res. (im Druck)

Bush I.E.: Species differences and other factors influencing adrenocortical secretion. Ciba Found. Colloqu. Endocrinol. 7 (1953) 210

Caldwell B.V., Scaramuzzi R.J., Tillson S.A. & Thorneycroft I.H.: Physiologic studies using antibodies to steroids. In:Péron F.G. & Caldwell B.V.: Immunologic methods in steroid determination. Appleton-Century-Croft, New York, 1970, p. 183

Caldwell B.V., Tillson S.A., Esber H. & Thorneycroft I.H.: Survival of tumours after immunization against estrogens.
Nature 231 (1971) 118

Coyotupa J., Parlow A.F. & Kovacic N.: Serum testosterone and dihydrotestosterone levels following orchiectomy in the adult rat.
Endocrinology 92 (1973) 1579

Corvol P. & Bardin C.W.: Species distribution of testosterone binding globulin.
Biol. Reprod. 8 (1973) 277

Cowchock F.S., Ferin M., Dyrenfurth I., Carmel P., Zimerman E., Brinson A. & Vande Wiele R.: Active Immunization with estradiol-17ß-bovine serum albumin in monkeys. in: Saxena B.B., Beling C.G. & Gandy H.M. (Hrsgb.): "Gonadotrophins":
Wiley-Interscience, New York, 1972

van Damme M.P., Robertson D.M., Romani P. & Diczfalusy E.: A sensitive in vitro bioassay method for luteinizing hormone (LH) activity.
Acta endocr. 74 (1973) 642

Depisch F. & Hasenörl R.: Experimentelle Untersuchungen über Insulinresistenz beim Diabetes mellitus.
Ztschr. ges. exp. Med. 58 (1928) 110

Dufau M.L., Catt K.J. & Tsuruhara T.: A sensitive gonadotropin responsive system: radioimmunoassay of testosterone production by the rat testis in vitro. Endocrinology 90 (1972) 1032

Dufy-Barbe L., Hendrick J.C., Franchimont P. & Faure J.M.: Dosage radio-immunologique de FSH et LH de lapine.
Ann. Endocr. Paris 33 (1972) 480

Erlanger B.F., Borek F., Beiser S.M. & Lieberman S.: Steroid-protein conjugates: I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone.
J. Biol. Chem. 228 (1957) 713

Erlanger B.F., Beiser S.M., Borek F., Edel F. & Lieberman S. The preparation of steroid - protein conjugates to elicit antihormonal antibodies. In: Williams C.A. & Chase M.W. (Hrsgb.) "Methods in Immunology Vol. I. Academic Press, New York, 1967

Elsässer F., Koenig A. & Schmidt D.: Der Testosteron- und Androstendiongehalt in Eberhoden in Abhängigkeit vom Alter.
Acta endocr. 69 (1972) 553

Erke C.D. & Foote W.C.: Antioestradiol serum in immature hamsters.
J. Reprod. Fert. 30 (1972) 451

Farah F.S. & Shbaklu Z.: Autoimmune progesterone urticaria.
J. Allerg. Clin. Imm. 48 (1971) 257

Federlin K.: Autoimmunphänomene bei Erkrankungen endokriner Drüsen.
Klin. Wschr. 47 (1969) 337

Federlin K.: Immunpathology of insulin. Clinical and experimental Studies.
Springer-Verlag, Berlin, 1971

Ferin M., Zimmering P.E., Lieberman S. & Vande Wiele R.L.: Inactivation of the biological effects of exogenous and endogenous estrogens by antibodies to 17ß-estradiol.
Endocrinology 83 (1968) 565

Ferin M., Zimmering P.E. & Vande Wiele R.L.: Effects of antibodies to estradiol-17ß on PMS-induced ovulation in immature rats.
Endocrinology 84 (1969) 893

Ferin M., Beiser S.M. & Vande Wiele R.L.: Immunology of gonadal steroids.
Vit. Horm. 31 (1973) 175

Ferin M., Dyrenfurth I., Cowchock S., Warren M. & Vande Wiele R.L.: Active immunization to 17ß-estradiol and its effects upon the reproductive cycle of the rhesus monkey.
Endocrinology 94 (1974) 765

Fleischer N., Abe K., Liddle G., Orth D.N. & Nicholson W.I.: ACTH antibodies in patients receiving depot porcine ACTH to hasten recovery from pituitary-adrenal suppression.
J. clin. Invest. 46 (1967) 196

Følling I. & Norman N.: Hyperglycemia, hypoglycemic attacks and production of anti-insulin antibodies without previous known immunization. Immunological and functional studies in a patient.
Diabetes 21 (1972) 814

Forest M.G.,Rivarola M.A. & Migeon C.J.: Percentage of binding of testosterone, androstendione and dehydro oandrosterone in human plasma.
Steroids 12 (1968) 323

Frantz A.G. & Raben M.S.: Induction of antibodies to HCG in patients with acromegaly. Excpt. Medica Found. Internat. Congr. Series 142 (1967) Abstract 97

Fraser H.M. & Gunn A.: Effects of antibodies to luteinizing hormone releasing hormone in the male rabbit and on the rat oestrus cycle.
Int. Res. Comm. Syst. 73-3 (1973) 15-3-1

Glass D. & Daly J.R.: Development of antibodies during long-term therapy with corticotrophin in rheumatoid arthritis. I. Porcine ACTH
Ann. rheum. Dis. 30 (1971) 589

Gláz E. & Vecsei P.: Aldosterone.Pergamon Press, Oxford (1971) p. 118

Gless K.H., Hanka M., Vecsei P. & Gross F.: Hypercorticism in rabbits immunized against corticosteroids.
Acta endocr. 75 (1974) 342

Golder M.P., Boyns A.R., Harper M.E. & Griffiths K.: An effect of prolactin on prostatic adenylate cyclase activity.
Biochem. J. 128 (1972) 725

Goldman B.D., Quadagno D.M., Shryne J. & Gorski R.A.: Modification of phallus development and sexual behavior in rats treated with gonadotropin antiserum neonatally.
Endocrinology 90 (1972) 1025

Goodfriend L. & Sehon A.H.: Preparation of estrone-protein conjugate.
Can. J. Biochem. Physiol. 36 (1958) 1177

Grayhack J.T. & Lebovitz J.M.: Effect of prolactin on citric acid of lateral lobe of Sprague-Dawley rat.
Invest. Urol. 5 (1967) 87

Grodsky G.M., Feldman R., Toreson W.E. & Lee J.C.: Diabetes mellitus in rabbits immunized with insulin.
Diabetes 15 (1966) 579

Hayashida T.: Inhibition of speriogenesis, prostate and seminal vesicle development in normal animals with antigonadotrophic hormone serum.
J. Endocr. 26 (1963) 75.

Heinert G. & Taubert H.D.: Effect of cyproterone acetate on testicular function in the rat. A karyometric study.
Endocrinology 61 (1973) 168

Herrmann M.: Experimentelle Untersuchungen zur Auswirkung einer einmaligen ACTH-Gabe. Ein Beitrag zur Kenntnis der homöostatischen Regulation.
Rev. Anat. Embryol. Cell. Biol. 39 (1967) 1

Hillier S.G., Cole E.N., Groom G.V., Boyns A.R. & Cameron E.H.D.: Effect of active immunization against testosterone-3-bovine serum albumin on circulating levels of testosteron, luteinizing hormone, prolactin and anti-testosterone titre in the male rat.
Steroids 22 (1973) 227

Hirata Y., Ishizu H. & Ito J.: A new syndrome: insulin autoimmune syndrome. Excpt. Medica Internat. Congr. Series 280 (1973) Abstract 282

Hoischen W. & Steigleder G.K.: Überempfindlichkeit gegen Progesteron bei Prurigo mit prämenstrueller Exazerbation.
Dtsch. med. Wschr. 91 (1966) 398

Humphrey J. & White R.: "Immunology for students in medicine".
Blackwell, Oxford, 1965

Illig R.: Growth hormone antibodies in patients treated with different preparations of human growth hormone (HGH).
J. clin. Endocr. Metab. 31 (1970) 679

James V.H.T. & Jeffcoate S.L.: Steroids.
Brit. med. Bull. 30 (1974) 50

Kawai A. & Yates F.E.: Interference with feedback inhibition of adrenocorticotropin release by protein binding of corticosterone.
Endocrinology 79 (1968) 1040

Kley H.K. & Krüskemper H.L.: Bestimmung von 11-Hydroxy- und 11-desoxycorticoiden aus der gleichen Plasmaprobe als Basis eines Metopiron-Kurztests.
Ztschr. Klin. Chem. 9 (1971) 520

Krebs E.G.: The mechanism of hormonal regulation by cyclic AMP. In:Scow R.O. (Hrsgb.) "Endocrinology" Excpt. Medica Amsterdam / American Elsevier Publishing Co., New York, 1973

Kulin H.E. & Reiter E.O.: Gonadotropin suppression by low dose estrogen in men: Evidence for differential effects upon FSH and LH.
J. clin. Endocr. Metab. 35 (1972) 836

Lacy D. & Pettitt A.J.: Sites of hormone production in the mammalian testis, and their significance in the control of male fertility.
Brit. med. Bull. 26 (1970) 87

Landon J., Friedman M. & Greenwood F.C. : Antibodies to corticotrophin and their relation to adrenal function in children receiving corticotrophin therapy.
Lancet 1967, 1, 652

Laurence K.A. & Ichikawa S.: Effects of active immunization with bovine luteinizing hormone on reproduction in the female rat.
Endobrinology 82 (1968) 1190

Leidl W., Hoffmann B. & Karg H.: Endokrine Regulation und jahreszeitlicher Rhythmus der Fortpflanzung beim Ziegenbock.
Zbl. Vetr. Med. A 17 (1937) 1336

Lewis J.H.: The antigenic properties of insulin.
J. Amer. Med. Ass. 108 (1937) 1336

Liao S., Lin A.L. & Tymoczko J.L.: Adenyl cyclase of cell nuclei isolated from rat ventral prostate.
Biochem. Biophys. Acta 230 (1971) 535

Lieberman S., Erlanger B.F., Beiser S.M. & Agate F.J.: Steroid-protein conjugates: Their chemical, immunochemical and endocrinological properties.
Rec. Progr. Horm. Res. 15 (1959) 165

Lindner H.R.: Androgens and related compounds in the spermatic vein blood of domestic animals. I. Neutral steroids secreted by the bull testis.
J. Endocr. 23 (1961) 139

Madhwa Raj H.G. & Moudgal N.R. : Hormonal control of gestation in the intact rat. Studies using specific antigonadotrophins.
J. Reprod. Fertil. 27 (1971) 309

Martini L.: Gonadotropins releasing hormones. In: Crosignani P.G. (Hrsgb.) Serono Symp. on Gonadotrophins and Gonadal Steroids.
Milano 1973 (im Druck).

Mietkiewski K. & Lukaszyk A.: The response of the rat testis to prolonged administration of an androgen antagonist (cyproterone).
Acta endocr. 60 (1969) 561

Mikhail G., Wu C.H., Perin M. & Vande Wiele R.L.: Radioimmunoassay of plasma estrone and estradiol. Steroids 15 (1970) 333

Mooser H. & Grilliches R.K.: Immunisierungsversuche mit Steroiden.
Ztschr. allg. Pathol. Bakteriol. 4 (1941) 375

Morse C.H., Horike N., Rowley M.J. & Heller K.G.: Testosterone concentrations in testes of normal men: Effects of testosterone proprionate administration. J. clin. Endocr. Metab. 37 (1973) 882

Neill J.D., Freeman M.E. & Tillson S.A.: Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. Endocrinology 89 (1971) 1448

Neri R.O., Tolksdorf S., Beiser S.M., Erlanger B.F., Agate F.J. & Lieberman S.: Further studies on the biological effects of passive immunization with antibodies to steroid - protein conjugates. Endocrinology 74 (1964) 593

Nieschlag, E.: Radioimmunoassay für Testosteron im Plasma. In: Breuer H. & Krüskemper H.L. (Hrsgb.) "Methoden der Hormonbestimmung", G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1974

Nieschlag E. & Loriaux D.L.: Radioimmunoassay for plasma testosterone.
Ztschr. klin. Chem. 10 (1972) 164

Nieschlag E., Loriaux D.L. & Lipsett M.B.: Radioligand assay for Δ^5-3ß-hydroxysteroids I. 3ß-hydroxy-5-androstene-17-one and its 3-sulfate.
Steroids 19 (1972) 669

Nieschlag E., Usadel K.H., Schwedes H., Kley H.K., Schöffling K. & Krüskemper H.L.: Alterations in testicular morphology and function in rabbits following active immunization with testosterone.
Endocrinology 92 (1973a) 1142

Nieschlag E., Usadel K.H., Kley H.K., Schwedes U., Herrmann J., Schöffling K. & Krüskemper H.L.: Induktion biologisch frustraner Hyperfunktion und Hypertrophie endokriner Drüsen durch aktive Immunisierung gegen das Effektorhormon.
Dtsch. med. Wschr. 98 (1973b) 469

Nieschlag E., Herrmann J., Usadel K.H., Schwedes U., Schöffling K. & Krüskemper H.L. : Thyroid hypertrophy and hyperfunction caused by active immunization with thyroid hormones.
J. Endocr. 57 (1973c) 555

Nieschlag E., Kley H.K. & Usadel K.H.: Production of steroid antisera in rabbits. In: Cameron E.H.D. & Griffiths K.: " Immunoassays for steroids ", Medical and Technical Publications Co., Lancaster 1974 (im Druck).

Odell W.D., Abraham G.E., Showsky W.R., Hescox M.A. & Fisher D.A.: Production of antisera for radioimmunoassay. In: Odell W.D. & Daughaday W.H. (Hrsgb.) "Principles of competitive protein binding assays", Lippincott Co., Philadelphia 1972

Ofner P.: Recent developments in the study of hormone effects and metabolism in prostate tissue. Symp. Dtsch. Ges. Endokr. 17 (1971) 147

Péron F.G. & Caldwell B.V. (Hrsgb.) : "Immunologic methods in steroid determination". Appleton-Century-Croft, New York, 1970

Pineda M.H., Lueker D.L., Faulkner L.C. & Hopwood M.L.: Atrophy of rabbit testes associated with production of antiserum to bovine luteinizing hormone. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125 (1967) 665

Quari S.K., Harbers L.H. & Spies H.G.: Inhibition of spermatogenesis and ovulation in rabbits with antiovine LH rabbit serum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123 (1966) 809

Raziano J., Cowchok S., Ferin M. & Vande Wiele R.: Estrogen-dependency of monamine-induced ovulation. Endocrinology 88 (1971) 1516

Raziano J., Ferin M. & Vande Wiele R.L.: Effects of antibodies to estradiol-17ß and to progesterone on nidation and pregnancy in rats. Endocrinology 90 (1972) 1133

Resko J.A.: Androgens in systematic plasma of male guinea pigs during development and after castration in adulthood.
Endocrinology 86 (1970) 1444

Resko J.A., Feder H.H. & Goy R.W.: Androgen concentrations in plasma and testis of developing rats.
J. Endocr. 40 (1968) 485

Rodbard D., Bridson W. & Rayford P.L.: Rapid calculation of radioimmunoassay results.
J. Lab. Clin. Med. 74 (1969) 778

Rosenfeld N.G. & O'Malley B.W.: Steroid hormones: Effects on adenyl cyclase activity and adenosine-3', 5'-monophosphate in target tissues.
Science 168 (1970) 253

Schmidt D.H. & Butler V.P.: Immunological protection against digoxin toxicity.
J. clin. invest. 50 (1971) 866

Schoen E.J. & Samuels L.T.: Testicular androgen biosynthesis following corticotrophin and human chorionic gonadotrophin administration.
Acta endocr. 50 (1965) 365

Shelly W.B., Preucel R.W. & Spoont S.S.: Autoimmune progesterone dermatitis.
J. Amer. med. Ass. 190 (1964) 35

Singhal R.L., Vijayvargiya R. & Ling G.N.: Cyclic Adenosinemonophosphate: Andromimetic action on seminal vesicular enzymes.
Science 105 (1970) 261

Skelley D.S., Brown L.P. & Besch P.K.: Radioimmunoassay
Clin. Chem. 19 (1973) 146

Slaunwhite W.R. & Sandberg A.A.: Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma.
J. clin. Invest. 38 (1959) 384

Slaunwhite W.R., Lockie G.N., Black N. & Sanberg A.A.: Inactivity in vivo of transcortin-bound cortisol.
Sciene 135 (1962) 1062

Steinberger E.: Hormonal control of mammalian spermatogenesis.
Physiol. Rev. 51 (1971) 1

Stevens V.C. & Crystle C.D.: Effects of immunization with hapten-coupled HCG on the human menstrual cycle.
Obstetr. Gynecol. 42 (1973) 485

Sundaram K., Tsoug Y.Y., Hood W. & Brindson A.: Effect of immunization with estrone-protein conjugate in rhesus monkeys.
Endocrinology 93 (1973) 843

Talaat M. & Laurence K.A.: Effects of active immunization with ovine FSH on the reproductive capacity of female rats and rabbits.
Endocrinology 84 (1969) 185

Talaat M. & Laurence K.A.: Impairment of spermatogenesis and libido through antibodies to luteinizing hormone.
Fertil. Steril. 22 (1971) 113

Tonutti E.: Die männliche Keimdrüse.
G. Thieme, Stuttgart, 1966

Vaitukaitis J., Robbins J.B., Nieschlag E. & Ross G.T.: A method for producing specific antisera with small doses of immunogen.
J. clin. Endocr. Metab. 33 (1971) 988

Vermeulen A.: The metabolic clearance rate and the metabolism of testosterone. in: James V.H.T., Serio M. & Martini L.: "The endocrine function of the human testes.
Vol. I, Academic Press, New York, 1973, 181

Watson J.F. & Butler V.P.: Biologic activity of digoxin-specific antisera.
J. clin. Invest. 51 (1972) 638

Weinstein A., Lindner H.R., Friedlander A.& Bauminger S.: Antigenic complexes of steroid hormones formed by coupling to protein through position 7: preparation from ^{4}-3-oxosteroids and characterization of antibodies to testosterone and androstenedione.
Steroids 20 (1972) 789

Wombacher H. & Körper F.: A simple competitive protein-binding assay for cyclic adenosine 3' : 5' monophosphate.
Ztschr. klin. Chem. 10 (1972) 260

Wright P.H.: The production of experimental diabetes by means of insulin antibodies.
Amer. J. med. 31 (1961) 892

Yalow R.S. & Berson S.A.: Assay of plasma insulin in human subjects by immunologic methods.
Nature 184 (1959) 1648

Zanisi M., Motta M. & Martini L.: Inhibitory effect of 5α-reduced metabolites of testosterone on gonadotrophin secretion.
J. Endocr. 56 (1973) 315

Zondek B. & Bromberg Y.M.: Endocrine allergy. I. Allergic sensitivity to endogenous hormones.
J. Allergy 16 (1945) 1

Zondek B. & Bromberg Y.M.: Endocrine allergy. Clinical reactions of allergy to endogenous hormones and their treatment.
J. Obstetr. Gynec.Brit. Emp. 54 (1947) 1

H. DANKVERMERK

Herrn Prof. Dr. H.L. Krüskemper danke ich für das fördernde Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat.

Die histologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. K.H. Usadel, Zentrum der Inneren Medizin der Universität Frankfurt / Main, durchgeführt. Herr Dr. H.K. Kley, 2. Medizinische Klinik der Universität Düsseldorf, bestimmte die prozentuale Bindung der Steroide im Serum.

Frau M. Pier und Fräulein G. Müller danke ich für technische Assistenz.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.